

TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI

FAKULTA TEXTILNÍ

**VLIV HYDROFILNÍCH/HYDROFOBNÍCH VLASTNOSTÍ
NANOVLÁKENNÝCH TKÁŇOVÝCH NOSIČŮ NA BUNĚČNOU ADHEZI**

**THE INFLUENCE OF HYDROPHILIC/HYDROPHOBIC PROPERTIES
OF NANOFIBROUS SCAFFOLDS ON CELL ADHEZION**

LIBEREC 2014-01-02

Bc. PAVLA SYKÁČKOVÁ

Zadání DP

Prohlášení

Byla jsem seznámena s tím, že na mou diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé diplomové práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li diplomovou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Diplomovou práci jsem vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím diplomové práce a konzultantem.

V Liberci dne 2. 1. 2014

.....

Podpis

Poděkování

Na tomto místě považuji za svou milou povinnost poděkovat především vedoucí diplomové práce Mgr. Janě Horákové, velké poděkování patří panu Ing. Petru Mikešovi, Ph.D., za cenné poznatky a rady. Dále bych ráda poděkovala panu Ing. Jiřímu Chaloupkovi, Ph.D., panu Ing. Jiřímu Chvojkovi, Ph.D. a v neposlední řadě paní Ing. Denise Zálešákové za poskytnutí informací a rad při tvorbě experimentu. Děkuji celé své rodině a přátelům za jejich podporu a trpělivost.

Dále bych ráda poděkovala Centralizovanému rozvojovému projektu č. 12091 s názvem Integrovaný systém vzdělávání v tkáňovém inženýrství, regenerativní medicíně a nanobiotechnologiích na UK, ČVUT a TUL.

ANOTACE

Rešerše diplomové práce se zabývá problematikou tkáňového inženýrství a biologie obecně. Je zde popsána metoda elektrostatického zvlákňování, parametry ovlivňující tento proces a v neposlední řadě vlastnosti vláknitvorných polymerů. Poslední kapitola rešerše se zabývá tématem smáčivosti, která je v této práci základním kamenem pro vyhodnocování testovaných polymerních materiálů. Polymery byly vybrány k testování pro jejich speciální vlastnosti, jako je biokompatibilita, případně biodegradabilita. Cílem práce bylo elektrostaticky zvláknit vybrané materiály a následně je otestovat. Vyrobené scaffoldy byly podrobeny zkoušce měření kontaktního úhlu, kde se zjišťovalo, zda se jedná o materiály hydrofilní nebo hydrofobní. Tyto ve vodě nerozpustné materiály byly dále biologicky testovány.

KLÍČOVÁ SLOVA:

Buňka, scaffold, adheze, proliferace, hydrofobicita, hydrofilita

ANNOTATION

This thesis deals with tissue engineering and biology in general. It is explained there also process of electrostatic spinning and its parameters. Not least it is explained there properties of fiber-forming polymers. The last chapter deals with research of wettability, which is the key of this work for the evaluation of the tested polymer. The polymers were chosen for test of their special properties as are biocompatibility or biodegradation. The aim was electrostatically spin the selected materials and test them. These scaffolds were subjected to the measurement of contact angle, where it was examined if the material is hydrophilic or hydrophobic. These water-insoluble materials were further biologically tested.

KEY WORDS:

Cell, scaffold, adhesion, proliferation, hydrophobicity, hydrophilicity

Obsah

Obsah	7
Seznam obrázků	11
Seznam tabulek	13
Seznam zkratek	14
Úvod	15
TEORETICKÁ ČÁST	17
1 Tkáňové inženýrství	18
1.1 Proces tkáňového inženýrství	19
1.2 Buňka – základní pojmy	20
1.2.1 Extracelulární matrix-ECM	22
1.3 Kultivace buněk	22
1.3.1 Kultivační podmínky	22
1.3.2 Kultivační média	23
1.4 Růst a množení buněk	23
1.4.1 Adheze	23
1.4.2 Buněčné proliferace	24
1.4.3 Apoptóza	24
2 Požadavky na scaffold	25
2.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti povrchu materiálu:	26
3 Nanovláknna	27
3.1 Historie nanovláken	28
4 Biomateriály	29
4.1 Polymery – makromolekulární látky	29
4.2 Přírodní polymery	29

4.2.1	Kolagen	30
4.2.2	Želatina	31
4.2.3	Chitin a chitosan (CS).....	31
4.3	Syntetické polymery.....	32
4.3.1	Polyvinylpyrrolidon (PVP).....	33
4.3.2	Polyvinylalkohol (PVA)	33
4.3.3	Polykaprolakton (PCL)	33
4.3.4	Polyethylenglycol- polyetylenoxid PEG-PEO.....	34
4.3.5	Polyakrylonitril (PAN)	34
4.3.6	Polyamid 6 (PA6)	35
5	Výroba scaffoldu	36
5.1	Textilní technologie	36
5.1.1	Elektrostatické zvlákňování	36
5.1.2	Nanospider	37
6	Smáčivost	39
6.1	Úhel smáčení, Youngova rovnice	39
6.2	Vliv smáčivosti materiálu na buněčnou adhezi.....	41
6.3	Měření smáčivosti materiálu	41
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST		42
7	Výroba scaffoldů	43
7.1	Použitá zařízení	43
7.1.1	Nanospider - NS Production Lines 500	43
7.1.2	Elektrostatické zvlákňování ze stříkačky (trysky), systém dvou jehel, zvlákňování z tyčky	43
7.1.3	UV lampa Noblelight Heraeus 200F	44
7.2	Zvlákňování polymerů	45
7.2.1	Proces síťování želatiny.....	53

8	Analýza vláknenného materiálu - scaffoldu	56
8.1	Použitá zařízení	56
8.1.1	Software pro měření průměru vláken	56
8.1.2	Měření průměru vláken.....	56
8.1.3	Zařízení a software pro měření kontaktního úhlu	58
8.1.4	Měření kontaktního úhlu scaffoldů	58
8.1.5	Zjišťování změny struktury vrstev po smáčení v H ₂ O a ETOH	59
8.2	Výsledky analýzy scaffoldů a diskuze	60
8.2.1	Měření průměru vláken scaffoldů	60
8.2.2	Měření kontaktního úhlu scaffoldů	61
8.2.3	Výsledky z porovnávání vzorků po smočení ve vodě a v ethanolu.....	62
9	Biologické testování tkáňových nosičů <i>in-vitro</i>	63
9.1	Osazení polymerních scaffoldů	63
9.1.1	Použité buňky	63
9.1.2	Použité chemikálie	63
9.2	Použitá zařízení	64
9.2.1	Bürkerova komůrka	64
9.2.2	Spektrofotometr	64
9.2.3	Invertovaný fluorescenční mikroskop	64
9.2.4	Rastrovací elektronový mikroskop - SEM.....	64
9.3	Použité metody.....	65
9.3.1	MTT test	65
9.3.2	Fluorescenční mikroskopie	65
9.3.3	SEM	66
9.4	<i>In-vitro</i> testování	66
9.4.1	Příprava buněk	66
9.4.2	Příprava materiálu	66

9.4.3	Příprava vzorků pro fluorescenční mikroskopii.....	67
9.4.4	Příprava vzorků pro elektronovou mikroskopii	67
9.4.5	Příprava vzorků pro MTT test	67
	Spektrofotometr	68
9.5	Výsledky a diskuze	69
9.5.1	Výsledky fluorescenčního mikroskopu	69
9.5.2	Výsledky SEM	69
9.5.3	Výsledky MTT testu	72
	Závěr	75
	Seznam použité literatury	78
	Zdroje obrázků	83
	Přílohy.....	84

Seznam obrázků

Obr. 1 Princip procesu tkáňového inženýrství dle [1]	20
Obr. 2 Znázornění prorůstání buněk vybranými materiály dle[2]	25
Obr. 3 Nanovlákná - lidský vlas dle [3].....	27
Obr. 4 Základní jednotka kolagenu dle [4]	30
Obr. 5 Schránky korýšů – chitosan dle [5]	32
Obr. 6 Elektrostatické zvlákňování z jehly dle [6]	36
Obr. 7 Elektrostatické zvlákňování z tyčky dle [7]	37
Obr. 8 Nanospider v provozu dle [8]	38
Obr. 9 Úhel smáčení: a) hydrofilní materiál,	39
Obr. 10 Kapka kapaliny umístěná na rovinném povrchu. Je zde vyznačena rovnováha sil povrchového napětí na obvodu smáčení. G značí plyn (gas), L kapalinu (liquid) a S pevnou látku (solid)	40
Obr. 11 Zvlákňování z trysky, systém čtyř jehel	44
Obr. 12 PVA 3000x a 8000x zvětšeno	46
Obr. 13 PCL 3000x a 8000x zvětšeno	47
Obr. 14 PVP 500x a 2000x zvětšeno	48
Obr. 15 PA6 2000x a 8000x zvětšeno	48
Obr. 16 PAN 1000x a 5000x zvětšeno	49
Obr. 17 10%PCL + 8%CS 3000x a 8000x zvětšeno	50
Obr. 18 12%PCL + 6%CS 3000x a 8000x zvětšeno	50
Obr. 19 14%PCL + 4%CS 3000x a 8000x zvětšeno	50
Obr. 20 PEO 5% 3000x a 5000x zvětšeno.....	51
Obr. 21 PEO 8% 3000x a 8000x zvětšeno.....	51
Obr. 22 Želatina 3000x a 8000x zvětšeno	52
Obr. 23 Zesíťovaná želatinová fólie	54
Obr. 24 Zesíťovaná želatina 1000x a 5000x zvětšeno	55
Obr. 25 Nis Elements 3.2.....	56
Obr. 26 Snímky profilu kapky z programu SeeSystem	58
Obr. 27 Porovnání rozdělení průměrů vláken jednotlivých scaffoldů a porovnání rozdělení průměrů PVP a PAN	60
Obr. 28 Závislost doby vzlínání na velikosti kontaktního úhlu	62

Obr. 29 MTT test	65
Obr. 30 Absorbance spektra formazanu rozpuštěném v roztoku.....	68
Obr. 31 Snímek vzorku PAD z fluorescenčního mikroskopu, 12. den testování, 100x zvětšeno	69
Obr. 32 PVA 1000x, 2000x, 2000x zvětšeno	70
Obr. 33 PA6 1000x, 1000x, 1000x zvětšeno	70
Obr. 34 PAN 2000x, 1000x, 1000x zvětšeno	70
Obr. 35 PVP 1000x, 3000x, 3000x zvětšeno	71
Obr. 36 PCL 540x, 1000x, 1000x zvětšeno	71
Obr. 37 10%PCL + 8%CS 1000x, 1000x, 1000x zvětšeno	71
Obr. 38 12%PCL + 6%CS 1000x, 1000x, 1000x zvětšeno	71
Obr. 40 Grafické znázornění metabolické aktivity buněk ve 2., 7. a 12. dni testování .	72
Obr. 39 14%PCL + 4%CS 1000x, 1000x, 1000x zvětšeno	72
Obr. 42 Kalibrační křivka	73

Seznam tabulek

Tab. 1 Přehled rozpouštědlových systémů a způsobu zvlákňování scaffoldů	45
Tab. 2 Statistické ukazatele měření průměrů vláken scaffoldů	57
Tab. 3 Smáčivost PCL + CS	59
Tab. 4 Smáčivost PCL	59

Seznam zkratek

PA	polyamid
PAN	polyakrylonitril
CA	acetát celulósy
PCL	polykaprolakton
PVA	polyvinylalkohol
CS	chitosan
PVDF	polyvinylidenfluorid
PEG	polyethylenglykol
PEO	polyethylenoxid
PVP	polyvinylpyrrolidon
GTA	glutaraldehyd
Mn	molekulární hmotnost
DMF	dimethylformamid
PBS	Phosphate Buffered Saline – fosfátový pufr
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FBS	fetální bovinní sérum
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium – kultivační médium
PEI	polyetherimid

Úvod

Napsání této práce podnítila diskuze v odborných kruzích, která byla značně nejednotná. Všeobecně panoval názor, že extrémně hydrofilní materiály neumožňují adhezi buněk, stejně jako hydrofobní materiály.

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, zda smáčivost polymerních materiálů má vliv na adhezi a proliferaci buněk. Adheze je schopnost buněk přilnout k povrchu materiálu, což má za následek množení a rozrůstání buněk po celém scaffoldu, nejlépe pak skrz jeho 3D strukturu. Adheze je zprostředkována pomocí buněčných povrchových receptorů - integrinů.

Tyto poznatky mohou pomoci při dalším vývoji tkáňových náhrad. Novodobé tkáňové inženýrství má snahu vyvíjet takové materiály, které budou organismem dobře přijímány a které by nahradily dnešní konvenční transplantace orgánů nebo umělé implantáty. Regenerativní medicína se zabývá vývojem, výrobou a testováním tkáňových náhrad. Konstruovaná tkáňová náhrada se skládá z nosiče (scaffoldu) a buněčné složky. Materiály používané k transplantaci náhrad musí být biokompatibilní. To znamená, že jsou tolerovány buňkami a nevyvolávají tak zánětovou reakci, neuvolňují potenciálně toxické látky apod. U některých scaffoldů, sloužících například jako náhrada tkáně, je vyžadována biodegradabilita. Tento materiál se po určité době rozloží a je nahrazen nově vzniklou regenerovanou tkání.

Smáčivost má velký význam z praktického i vědeckého hlediska. Je to vlastnost kapalin přilnout na povrchu některých pevných látek. Tyto látky se mohou jevit jako homogenní, u kterých se vlastnosti (např. hustota, teplota, barva) v celém objemu nemění, nebo heterogenní, které mají různorodé vlastnosti. Smáčivost může být charakterizována kontaktním úhlem, který svírá tečna k povrchu kapaliny v místě dotyku kapky s povrchem tuhé fáze. Kontaktní úhel smáčení je jednou z mála přímých

metod měření vlastností třífázového rozhraní - pevná látka, kapalina, plyn. Čím je hodnota kontaktního úhlu nižší, tím je smáčení povrchu tuhé látky danou kapalinou lepší. Povrch se dá považovat za smáčivý, pokud je kontaktní úhel naměřený na tomto povrchu menší než 90° . Naopak pokud je kontaktní úhel větší než 90° jsou vlastnosti povrchu nesmáčivé. V případě, že se ke smáčení materiálu použije voda, mluvíme o povrchu hydrofilním nebo hydrofobním.

Jak již bylo naznačeno, k testování bylo vybráno několik materiálů: polyethylenoxid, rybí želatina, polyamid, polyakrylonitril, polyvinylpyrrolidon, polykaprolakton, směsi polykaprolaktonu a chitosanu, acetát celulózy a polyvinylalkohol. Polymery byly zvlákněny metodou elektrostatického zvláknování. Vliv na zvláknování mají různé faktory např. vlhkost a teplota vzduchu, průměr jehly, vzdálenost kolektoru a jehly, použité napětí a hodnota průtoku. Tyto materiály musí být nerozpustné ve vodě, čehož se dosahuje různými síťovacími prostředky. Řetězce síťovaných polymerů jsou spojeny chemickými vazbami tak, že tvoří trojrozměrnou prostorovou síť. Materiály, ze kterých se podařilo vytvořit scaffold, a které se podařilo zesíťovat (PVA, PA6, PAN, PVP, PCL, PCL + CS), byly podrobeny měření kontaktního úhlu, měření průměru vláken a biologickému testování *in-vitro*.

Scaffoldy byly sledovány a měřeny po dobu dvou, sedmi a dvanácti dnů. Jako vyhodnocovací metoda byl použit MTT test. Tento test vykazuje hodnoty metabolické aktivity buněk. Pro vizuální posouzení se dále pořizovaly snímky z elektronového a fluorescenčního mikroskopu. V závěru experimentu byla provedena statistická analýza získaných dat.

TEORETICKÁ ČÁST

1 Tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství je multidisciplinární obor zahrnující biologii, fyziku, chemii, počítačovou technologii, medicínu, vývoj materiálu, zvěrolékařství atd. Můžeme ho chápat jako využití chemických, biologických a lékařských principů vedoucích k obnovení, restaurování nebo regeneraci tkání, tedy pro tzv. regenerativní medicínu. Tkáňového inženýrství bylo vyvinuto pro splnění rostoucí poptávky po bezpečných, funkčních a snadno dostupných náhradách nevratně poškozených tkání a orgánů. Obor se zabývá biologickými náhradami, jejich vývojem a využitím buněk a molekul k vytvoření nové vhodné tkáně. Je možné vytvořit náhradu kosti, chrupavky, krevní cévy, močového měchýře, srdeční chlopně, kůže a také svalů. Moderní tkáňové inženýrství se snaží vyvíjet takové materiály, které budou organismem snáze přijímány a které by nahradily dnešní konvenční transplantace orgánů nebo umělé implantáty. Regenerativní medicína se zabývá vývojem, výrobou a testováním tkáňových náhrad [1, 2].

První biomateriály umožňovaly adhezi buněk pouze na svém povrchu. Byly konstruovány jako " dvojrozměrné " a nebyly biologicky rozložitelné. Biomateriály nové generace mají tzv. trojrozměrnou porézní strukturu a tím umožňují růst a diferenciaci buněk uvnitř materiálu. Zde dochází k postupné degradaci materiálu a současně ho nahrazuje regenerovaná plně funkční tkáň [2].

Konstruovaná tkáňová náhrada se skládá z nosiče – scaffoldu a buněčné složky. Scaffold znamená v angličtině lešení, konstrukce, skelet. Slovo scaffold vyjadřuje v tkáňovém inženýrství tzv. podpůrnou konstrukci pro růst buněk a celých tkání.

Scaffolds mohou být dvojího typu:

- z biologických molekul (proteiny extracelulární matrix, např. kolagen, elastin, fibronektin, laminin, fibrin, kyselina hyaluronová)

- z umělých materiálů (syntetické polymery, materiály na bázi uhlíku, kovy a jejich slitiny, keramika)

Scaffold dává buňkám prostor pro růst a množení, nahrazuje ECM, která byla zničena nemocí, zraněním nebo vrozenou vadou. Scaffold transplantovaný do těla musí splňovat určité požadavky. Materiál by měl disponovat dvěma důležitými vlastnostmi – biokompatibilitou a biodegradabilitou. Biokompatibilita je schopnost materiálu vyvolávat přijatelnou odezvu hostitele při dané aplikaci. Takový materiál je tolerován buňkami bez cytotoxického, mutagenního a imunogenního působení. Biodegradabilita materiálu způsobuje fyzikální a chemickou degradaci, při níž dochází k rozkladu dané látky [1, 3].

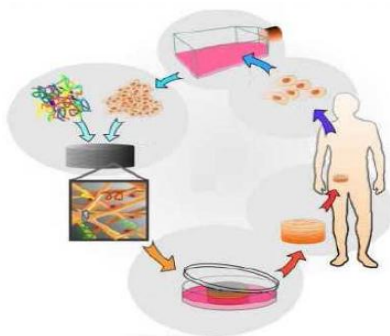
Materiály, ze kterých je scaffold vyráběn můžeme rozdělit následujícím způsobem:

- Bioinertní – neumožňuje adsorpci proteinů, nepodporuje adhezi buněk a tím brání aktivaci imunitního systému, srážení krve, trombózy atd.
- Bioaktivní – umožňuje migraci, proliferaci, diferenciaci, dlouhodobou životaschopnost a fungování pokud možno kontrolovatelným způsobem, napodobují vlastnosti molekul extracelulární matrix (ECM), růstové faktory, hormony, enzymy, regulují a specifikují chování buněk
 - Dvourozměrný materiál - plochy jsou osídlené buňkami v souvislých neimunogenních polopropustných vrstvách, např. srdeční chlopně, cévní protézy aj.
 - Trojrozměrný scaffold - vytváření tzv. " hybridních " biologických umělých orgánů např. pro výstavbu umělých cév, kostí, chrupavek a orgánů jako jsou slinivka břišní nebo játra [2, 3, 4]

1.1 Proces tkáňového inženýrství

Proces tkáňového inženýrství se skládá při standardním postupu z několika částí, jak je vidět na obrázku 1. U náhrady chrupavky se v první řadě odebere z těla pacienta (nebo

pokusného zvířete) štěp autologních chondrocytů. Dále se provede kultivace buněk *in-vitro*¹, při použití růstových faktorů dojde k podpoře diferenciaci a růstu. Současně je nutné vyrobit scaffold s požadovanými vlastnostmi. Po dosažení potřebného množství buněk se tyto buňky aplikují na připravený scaffold. Sleduje jejich adheze, růst a proliferace skrz celý objem scaffoldu. Po určité době kultivace buněk je možné scaffold implantovat na postižené místo. Očekává se jeho degradace, která musí být shodná s dobou, za kterou se vytvoří nová tkáň v těle[1].



Obr. 1 Princip procesu tkáňového inženýrství dle [1]

1.2 Buňka – základní pojmy

Buňka je základní jednotkou života. Můžeme tedy říci, že to co je menší než buňka, nemůže být nazváno živým. Jedinou možností, jak získat více buněk, je dělení těch, které již existují. Všechny živé organismy jsou výsledkem opakovaného buněčného dělení a růstu již od počátku vzniku života. Buňka se množí uspořádaným sledem akcí, během kterého se duplikuje. Tento proces se nazývá buněčný cyklus a je základním mechanismem, kterým se rozmnožuje vše živé [5].

Buňka:

- nejmenší samostatný útvar schopný samostatné existence a rozmnožování
- otevřený systém udržující obousměrný tok látek, energie a informací

¹ Z lat. ve skle, v laboratorních podmínkách.

- tvar buněk- u bakterií a rostlin je stálý - daný pevnou buněčnou stěnou
- živočišné buňky - tvar je stálý i proměnlivý
- buňky rozdělujeme na prokaryotické (prvojaderné) a eukaryotické (jaderné)

Jak bylo řečeno výše, tkáňové inženýrství využívá k tvorbě tkáňové náhrady buněčnou složku a scaffold. Podmínkou pro úspěšnou léčbu je volba vhodných buněk pro danou aplikaci.

Pro přípravu tkáně se používají jak kmenové, tak i diferencované buňky. Zdrojem pro kůži jsou například *epiteliální buňky*². Endotelové buňky se používají pro obnovu cév, *chondrocyty*³ pro chrupavku a *osteoblasty*⁴ pro kost. Pro regeneraci svalové tkáně se používají svalové buňky. Fibroblasty jsou zdrojem pro vazivové tkáně. Tyto buňky jsou naprogramovány pro tvorbu specifických specializovaných buněk a tkání [6,7,8].

Rozdělení buněk:

- Autologní – zdrojem je pacientova zdravá tkáň, shodný je dárce i příjemce, nehrozí odmítnutí imunitního systému
- Alogenní – buňky pocházejí z různých jedinců stejného druhu
- Heterogenní – dárce buněk je jiný než příjemce, například člověk – prase, nebezpečí odmítnutí imunitního systému

Další dělení:

- Diferencované – tkáňově specifické, zdrojem je primární tkáň
- Kmenové – nespecifické buňky, mají schopnost proliferovat a diferencovat se do různých tkání

² Tvoří epitelovou tkáň pokrývající vnitřní a vnější povrchy organismu.

³ Hlavní buňka vyskytující se v chrupavce.

⁴ Kostní buňka.

1.2.1 Extracelulární matrix-ECM

Extracelulární matrix je tvořena z molekul proteinů a polysacharidů vyplňující mezibuněčný prostor. Skládá se z fibrilárních proteinů, z glykosaminoglykanů a glykoproteinů. Buňky jsou k ECM přichycovány pomocí integrinů. Umožňuje uchycení buněk, vzájemnou komunikaci, přísun živin, vody atd. Extracelulární matrix je produkována buňkami pojivových tkání – fibroblasty (většina pojivových tkání), osteoblasty (kost), chondroblasty (chrupavka). Fibrilární proteiny ECM jsou tvořeny kolagenem, elastinem, fibronectinem a lamininem. Extracelulární matrix je buňkami sice produkována, ale není v nich umístěna. Liší se svými fyzikálními vlastnostmi, podle vlastností a funkce příslušné tkáně. Kostí a zubů mají ECM velmi tvrdou. V chrupavce a v pojivové tkáni kůže je ECM pórovitá a ve šlachách je velmi pružná. ECM se může vyskytovat také v tekuté formě – plasma představuje ECM krve [6, 9].

1.3 Kultivace buněk

Buněčná kultura je systém, kdy se *in-vitro* kultivují buňky za daných podmínek. Tato technika se aplikuje při výzkumu i ve výrobě. Využívají se převážně savčí buňky, v menší míře rostlinné a buňky hmyzu. Zdrojem savčích buněk může být člověk nebo laboratorní zvíře. Kultivace buněk probíhá v umělém kultivačním médiu za podmínek, které můžou, ale nemusí odpovídat podmínkám *in-vivo*⁵.

1.3.1 Kultivační podmínky

Pro dobrý růst a proliferaci buněk je zapotřebí zajistit vhodné kultivační podmínky. Mezi nejdůležitější patří složení kultivačního média, povrch kultivační nádoby a další faktory jako je teplota či složení atmosféry. Buňky se zpravidla kultivují při teplotě 37°C, která odpovídá teplotě těla. Aby se zabránilo odpařování vody a nedošlo tak ke změně koncentrace roztoku, udržuje se vlhkost atmosféry kolem 90%.

⁵ Z lat. v těle, v živém organismu.

1.3.2 Kultivační média

Kultivační médium napodobuje extracelulární tekutinu. Obsahuje velké množství živin, které umožňují růst buněk. Médium musí mít požadované fyzikálně-chemické vlastnosti a vhodnou koncentraci látek, které buňky potřebují k životu a množení. Těchto látek může být v jednom roztoku až několik desítek. Mezi nejvýznamnější látky obsažené v kultivačních médiích patří anorganické soli, pufrý, glukosa, vitamíny, bílkoviny, růstové faktory, některé peptidy, mastné kyseliny a lipidy atd.

Sérum zastává v médiu velmi důležitou funkci. Doplnuje ho o růstové faktory a o látky napomáhající adhezi buněk. Koncentrace bílkovin v roztoku brání také jejich mechanickému poškození. Anorganické soli a pufrující složky udržují stále pH roztoku a osmotický tlak média. Zdroje energie např. glukosa opět napomáhají dobrému růstu a množení buněk. Antibiotika zabráňují kontaminaci bakteriemi. Nejčastěji se přidává penicilin a streptomycin [10, 11].

1.4 Růst a množení buněk

1.4.1 Adheze

Adheze je schopnost materiálu spolu přilnout. Adheze buněk je podmíněna účastí adhezních proteinů. Jde o různorodou skupinu proteinů, které tvoří specifické receptory na povrchu buněk. Jsou důležité pro organizaci extracelulární matrix, regulují buněčné interakce a ovlivňují migraci buněk [5].

Integriny jsou skupina membránových receptorů, které se vážou na extracelulární matrix a jiné buňky. Integriny jsou nejpočetnější a nejvíce univerzální skupina molekul buněčné adheze. Jsou to adhezivní molekuly, které zprostředkují buněčné interakce s prostředím. Integriny se skládají z alfa (α) a beta (β) řetězce. Každý z těchto řetězců je

vytvářen jako samostatný protein objevující se v mnoha kombinacích. Integriny se vyskytují na povrchu téměř všech druhů buněk u většiny živočichů [10].

Bez receptorová buněčná adheze na scaffoldech znamená, že se nespecifické interakce mezi buňkou a materiálem uskutečňují přes tzv. slabé chemické vazby, jako jsou vodíkové vazby, elektrostatické, polární aj. Tento typ interakce, na rozdíl od adheze zprostředkované integriny, nezajistí přenos odpovídajících signálů z extracelulárního prostředí do buněk a tím i přežití buněk, závislých na ukotvení. Pokud buňky nejsou schopny syntetizovat a ukládat své vlastní molekuly ECM v poměrně krátkém čase podstoupí apoptózu, neboli programovanou buněčnou smrt [2].

1.4.2 Buněčné proliferace

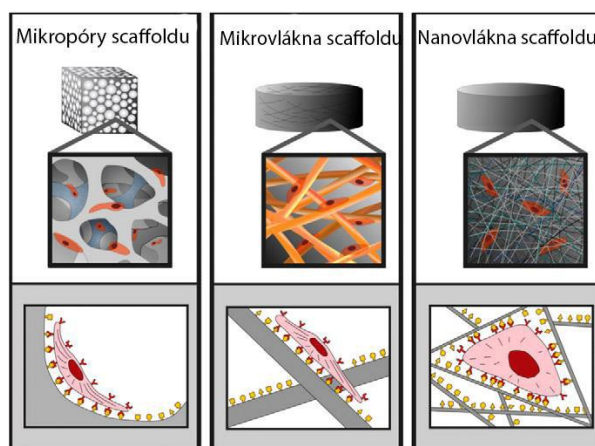
Proliferace (z lat. proles – potomstvo, fero-nesu) znamená hojné množení, bujení, novotvoření, například skupiny buněk.

1.4.3 Apoptóza

Apoptóza je jeden z hlavních typů programované buněčné smrti, probíhající především u živočichů a v některých případech i u rostlin a dalších organismů. Zahrnuje sled biochemických procesů vedoucích k typickým změnám vzhledu buňky. Následně dochází k šetrnému odstranění zbytků této buňky (a nikoliv k zánětu) [5].

2 Požadavky na scaffold

Scaffold musí splňovat určité vlastnosti a požadavky v závislosti na způsobu jeho využití. Měl by prokazovat kompatibilní biologické a fyzikální vlastnosti. Hlavní funkce scaffoldu je poskytnout tkáni dočasnou podporu a usnadnit tím její regeneraci. Z toho vyplývá, že musí mít dostatečnou mechanickou integritu a udržet si svůj tvar od implantace až do konce jeho životnosti. Dalšími důležitými faktory pro výběr vhodného materiálu je biodegradabilita, tj. přirozená degradace, kdy je scaffold absorbován lidským tělem bez vzniku vedlejších efektů. Rychlost degradace se rovná rychlosti formování tkáně. Produkty degradace polymeru nesmí být toxické ani podporovat zánět *in-vivo*. Chemická degradace může probíhat dvěma způsoby. Za přítomnosti vody, tzv. hydrolytická degradace-hydrolyza, nebo za pomoci enzymů tj. enzymatická degradace. Schopnost rozmnožování buněk závisí na fyzikálních a strukturních vlastnostech materiálu. Vysoká porozita, propojení pórů a povrchová struktura má pozitivní vliv na adhezi, proliferaci a migraci buněk. Ideálním prostředím pro adhezi a proliferaci buněk jsou scaffoldy, jejichž vlákna či póry se pohybují v řádech nanometrů. Díky průměrům nanovláken, které jsou menší než buňky, jsou buňky schopné se organizovat kolem vláken a migrovat [12]. Na obrázku 2 je znázorněný rozdíl mezi mikrovláknami a nanovláknami, na nichž jsou nasazené buňky. Je očividné, že nanovláknina poskytuje buňkám vhodnější prostředí pro jejich adhezi a proliferaci.



Obr. 2 Znázornění prorůstání buněk vybranými materiály dle[2]

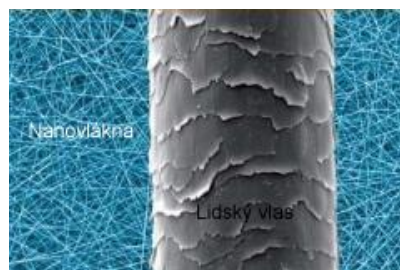
Fyzikálně-chemické vlastnosti polymeru ovlivňují typ a množství adsorbovaných molekul, dále jejich flexibilitu, možnost reorganizace apod. Změnou těchto vlastností dokážeme regulovat adsorpci proteinů a buněčnou adhezi.

2.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti povrchu materiálu:

- Přítomnost určitých chemických funkčních skupin (-OH, -NH₂)
- Povrchová energie, polarita, smáčivost
- Morfologie povrchu (drsnost, topografie; velikost, tvar a vzdálenost nerovností, nanodrsnost)
- Mechanické vlastnosti povrchu materiálu (tuhost, flexibilita)
- Elektrické vlastnosti materiálu (náboj, vodivost)

3 Nanovláknna

Znakem nanovláknna je, že jeho průměr je menší než jeden mikrometr a délka je zpravidla o dva a více řádů vyšší. Nanovláknna se v praxi téměř nikdy nevyskytují samostatně (např. jako mikrovláknna), jsou uspořádána do vyšších strukturních a prostorových 3D celků, se kterými lze reálně manipulovat. Nanovláknna se vyskytují v různých formách, jako nanovláknenné příze, vrstvy, objemové útvary aj. Na obrázku 3 můžeme vidět shluk nanovláken v porovnání s lidským vlasem.



Obr. 3 Nanovláknna - lidský vlas dle [3]

Nanovláknna mají díky své struktuře speciální vlastnosti, díky kterým nacházejí využití v rozličných oblastech. Dají se používat k filtraci, ve zdravotnictví, automobilovém průmyslu, energetice a dalších odvětvích jako je stavebnictví, automobilový průmysl, kosmetika atd. Nanovláknna jsou extrémně lehká, mají velký měrný povrch, vysokou porositu a další cenné vlastnosti. V současnosti mají největší využití v oblasti vzdušné filtrace, kde odstraňují submikronové částice společně s viry a bakteriemi [13].

Nanovláknna se mohou vyrábět různými způsoby:

Textilní způsob výroby:

- Tkaniny
- Pleteniny
- Netkané textilie

Netextilní způsob výroby:

- Solvent casting
- Salt leaching
- Rapid prototyping
- Zpěňování plynem
- Sušení za mrazu [10]

3.1 Historie nanovláken

První experimenty pro výrobu nanovláken se uskutečnily mezi lety 1900-1905. Tehdy byl patentován první popis technologie pro výrobu nanovláken Antonem Formhalsem. Roku 1966 patentoval Prof. Harold L. Simons přístroj, který dokázal vyrobit ultratenké a ultralehké tkaniny za pomoci elektrostatického zvlákňování. Prof. Peter K. Baumgarten v roce 1971 vyvinul přístroj na elektrostatické zvlákňování akrylových vláken. Na tyto vědce a jejich pokračovatele navázal později tým profesora Oldřicha Jirsáka z Technické univerzity v Liberci svou výzkumnou činností.

První technologie umožňující výrobu nanovláken přišla na trh v 80. letech minulého století. Většina těchto technologií funguje pouze v laboratorních podmínkách. Nejčastějším principem výroby nanovláken je metoda elektrostatického zvlákňování, která je poměrně zdlouhavá. Díky nové technologii Nanospider nastal v roce 2005 zvrat. Technologie, kterou uvedla na trh firma Elmarco byla první na světě, která umožnila průmyslovou výrobu nanovláken [13].

4 Biomateriály

Jak již bylo řečeno, hlavním problémem procesu tkáňového inženýrství je vhodný výběr biomateriálu, který musí být biokompatibilní, případně biodegradabilní. Potenciálními materiály, které se osvědčily při pokusech pro biomedicínské aplikace jsou kovy, keramika, polymery a jejich kombinace. Kov a keramika našly uplatnění zejména v oblasti ortopedických tkáňových náhrad. Nejsou však biologicky rozložitelné a špatně se zpracovávají [4].

4.1 Polymery – makromolekulární látky

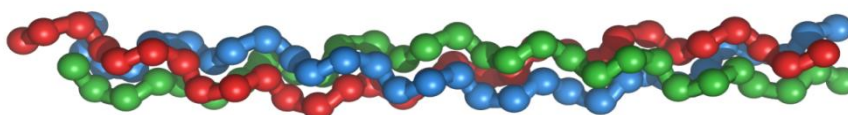
Makromolekula je rozsáhlá molekula s velkou molární hmotností. Je složená z velkého počtu atomů vázaných chemickými vazbami do dlouhých řetězců. Atomy v makromolekule jsou vázány kovalentními vazbami, molekuly Van der Waalsovými silami. Tyto řetězce tvoří pravidelně se opakující části, které nazýváme stavební nebo monomerní jednotky (mery). Podle původu rozlišujeme polymery přírodní a syntetické [14].

4.2 Přírodní polymery

Přírodní polymery se od syntetických polymerů liší především stavbou polymerního řetězce a složitější strukturou molekul. Přestože jsou biokompatibilní, jejich aplikace je značně omezená pro jejich obtížné zpracování. Vzhledem k tomu, že je degradace těchto polymerů závislá na enzymatických procesech, může se rychlost degradace lišit od pacienta k pacientu. Přírodní polymery používané pro aplikace jsou agaróza, alginát, kyselina hyaluronová, fibrin, chitosan, kolagen aj. [15].

4.2.1 Kolagen

Mezi polypeptidy, ze kterých se nejčastěji nanovláknna připravují, patří kolagen a želatina. Kolagen je extracelulární, ve vodě nerozpustná vláknitá bílkovina (skleroprotein), která tvoří stavební hmotu pojivových tkání např. v chrupavkách, šlachách, kostech a kůži. V současnosti je známo nejméně 27 rozdílných typů kolagenů. Typ kolagen I je nejvíce se vyskytující kolagen v pojivové tkáni. Na obrázku 4 jsou zobrazeny kolagenové molekuly složené ze tří α -řetězců propletených v kolagenu triple-helix. Tvoří 25 - 30 % všech proteinů v těle savců, ve formě kolagenních vláken je složkou mezibuněčné hmoty. Kolagen tvoří až 30% hmotnost bílkoviny člověka, 10% celkové hmotnosti člověka a až 70% kůže. Je zodpovědný za pružnost, pevnost, správné navlhčení kůže a soustavné ponoření jejích buněk. Kolagenní vlákna jsou komplexní vláknitou strukturou. Vyskytují se ve všech typech pojivových tkání. Jsou měkká, ohebná, nepružná a vysoce pevná v tahu. Využívá se zejména k opravě a regeneraci měkkých tkání. Kolagen má poměrně špatné mechanické vlastnosti a je zde malá kontrola nad biologickou rozložitelností. K přípravě kolagenních nanovláken se využívá elektrostatické zvlákňování roztoku lyofilizovaného kolagenu v 1,1,1,3,3,3 hexafluoropropan-2-olu, 2,2,2-trifluorethanolu nebo 1,1,1,3,3,3-hexafluoropropan-2-onu. Tato rozpouštědla jsou příliš drahá a ekologicky nešetrná, tudíž se snižují vyhlídky na budoucí průmyslovou výrobu. Při zvolení jiných rozpouštědel dochází k destrukci kolagenové struktury a ztrátě jeho unikátních vlastností (nerozpustnost ve vodném prostředí a mechanická pevnost). V současnosti je kolagen využíván pro zvýšení hydrofility některých materiálů např. PLLA a PCL, zároveň však zhoršuje mechanické vlastnosti těchto polymerů. [16,17,18].



Obr. 4 Základní jednotka kolagenu dle [4]

4.2.2 Želatina

Želatina se získává částečnou hydrolýzou kolagenu. Je hlavní složkou kostí, pokožky a chrupavek. Zdrojem pro získání želatiny bývala prasečí kůže, dále také vepřové a hovězí kosti. Ty jsou v současnosti na ústupu kvůli zvýšenému riziku virových onemocnění. Nyní se želatina získává z rybí kůže. Vlastnosti želatiny ovlivňuje druh a stáří zvířete, ze kterého je získávána a také typ kolagenu. Výsledný produkt - želatina, má zásadně jiné vlastnosti než kolagen. Stává se rozpustnou v řadě běžných rozpouštědel (voda, zředěné organické a minerální kyseliny), ale také ztrácí mechanické vlastnosti kolagenu. Velkou rozpustnost želatiny lze omezit dodatečným chemickým síťováním. Nejčastěji se používají k zesílení páry glutaraldehydu (GTA). Nanovlákná vznikají elektrostatickým zvlákňováním. Vzhledem k biokompatibilním a biodegradabilním vlastnostem mají želatinová vlákna velmi dobré předpoklady pro použití v regenerativní medicíně. Využívá se ve farmacii, kosmetickém a potravinářském průmyslu [16,18].

4.2.3 Chitin a chitosan (CS)

Chitin a chitosan (CS) jsou biopolymerní polysacharidy. CS vytváří základní stavební jednotku u bezobratlých živočichů (např. krunýř korýšů, krovky hmyzu). Mají velké strukturální možnosti chemických a mechanických úprav k vytvoření nových vlastností, funkcí a aplikací, zejména v biomedicínské oblasti. Chitin je málo rozpustný a rozpouští se např. ve fluorovaných alkoholech a acetonu. Obrázek 5 zachycuje prázdné schránky korýšů.

CS je biokompatibilní, biologicky rozložitelný, netoxický a antimikrobiální. Díky lepší rozpustnosti se zpracovává chitosan, což je částečně *deacetylovaný*⁶ derivát chitinu. Nanovlákná z chitosanu je téměř nemožné vyrobit samostatně kvůli jeho vysoké viskozitě, proto se přidává do roztoku s jinými polymery např. s PCL. Jelikož chitosan

⁶ Deacetylase chitinu je odstranění acetylové skupiny, odebrání acetylové skupiny CH₃CO z cílového proteinu.

vykazuje malou pevnost, směsováním se tato vlastnost může zlepšit. Nanovlákná vznikají elektrostatickým zvlákňováním. Chitosan je rozpustný ve vodných roztocích kyselin, např. kyseliny octové nebo mravenčí. Vlákná musí být pro možnost dalšího použití chemicky stabilizována dodatečným síťováním aldehydy. Chitosan je porézní materiál a pro výrobu scaffoldu se využívá proces lyofilizace a elektrostatického zvlákňování [16,19,20,21].



Obr. 5 Schránky korýšů – chitosan dle [5]

4.3 Syntetické polymery

Syntetické neboli umělé polymery mají řadu výhod oproti přírodním polymerům. Jednou z důležitých vlastností je vysoká mechanická pevnost. Jejich vlastnosti jsou předvídatelné, zpracovávají se do různých tvarů a velikostí. Fyzikální a chemické vlastnosti mohou být snadno upraveny, mechanické vlastnosti a degradace mohou být změněny chemickým složením.

Významnou skupinou biologicky rozložitelných polymerů jsou polyester. Mají dlouhou historii použití jako syntetický biologicky odbouratelný materiál. Syntetické polymery jsou obecně degradovány jednoduchou hydrolýzou. Nejvýznamnějšími zástupci jsou například polymléčná kyselina (PLA), polyglykolová kyselina (PGA), kopolymer kyseliny polymléčné a polyglykolové (PLGA) a polykaprolakton (PCL). Další používané polymery jsou polyvinylalkohol, polyethylenoxid, polyvinylpyrrolidon aj. [14, 22].

4.3.1 Polyvinylpyrrolidon (PVP)

Polyvinylpyrrolidon (PVP), také obvykle nazvaný polyvidon nebo povidon, je polymer vyrobený z monomeru N-vinylpyrrolidonu. Neobvyklá vlastnost PVP je jeho rozpustnost ve vodě a dalších polárních rozpouštědlech. PVP se využívá v oblasti léčiv jako pojivová látka pro tablety, rozpouštěcí činidlo pro injekční podávání léků, kosmetickém průmyslu a jako prostředek pro úpravu a čištění textilu [23].

4.3.2 Polyvinylalkohol (PVA)

Polyvinylalkohol je pevná látka, která podléhá hydrolyze, tj. při kontaktu s vodou dochází k jeho rozkladné reakci. Má hydrofilní charakter. Materiál je odolný vůči oleji, tuku a rozpouštědlu. PVA je dobře dostupný, levný a zcela netoxický polymer. Disponuje vysokou pevností v tahu a pružností, která se při kontaktu s vodou snižuje. Využívá se k výrobě lepidel, zahušťovadel, fólií nebo vinylových vláken. Díky jeho vlastnostem je často využíván k imobilizaci buněk a enzymů [16,24].

4.3.3 Polykaprolakton (PCL)

Polykaprolakton (PCL) je biologicky odbouratelný a biokompatibilní alifatický polyester. Získal velkou pozornost v posledních několika letech pro jeho potenciální využití v biomedicínských aplikacích, jako je tkáňové inženýrství a kostní náhrady, dále také v různých průmyslových aplikacích, jako jsou počítače nebo mobilní telefony. PCL je svým chemickým složením podobný PLA a PGA. Degraduje pomocí hydrolyzy, která však probíhá pomalu. Degradace může trvat až 24 měsíců a je velice nestabilní. Z těchto důvodů se PCL kombinuje s jinými druhy polymerů, například se škrobem. Jako vhodné rozpouštědlo lze zvolit chloroform nebo kyselinou octovou. Výběr rozpouštědla závisí na požadavcích výsledného scaffoldu. Nanovláknna se připravují elektrostatickým zvlákněním. Vzhledem k nízkému bodu tání (60 °C) převládá

zpracování z taveniny. Polykaprolakton je hydrofobní polymer. Směšováním s jinými polymery např. s kolagenem lze dosáhnout hydrofilního povrchu [16,25, 26, 27].

4.3.4 Polyethylenglycol- polyetylenoxid PEG-PEO

Polyethylenglykol (PEG) známý také jako polyetylenoxid (PEO) nebo polyoxyethylen (POE), je komerčně nejvýznamnějším polyetherem. PEG, PEO nebo POE jsou oligomery nebo polymery ethylenoxidu. Všechny tři názvy jsou chemicky synonymní, ale historicky se jako PEG označují oligomery a polymery s molární hmotností do 20 000 g/mol, jako PEO polymery s molární hmotností nad 20 000 g/mol a jako POE polymery libovolné molární hmotnosti. PEG a PEO jsou kapaliny nebo nízkotající tuhé látky, v závislosti na molární hmotnosti. PEG se připravují polymerizací ethylenoxidu a jsou komerčně dostupné v široké škále molárních hmotností PEG od 300 g/mol do 10 000 000 g/mol. Zatímco PEG a PEO s různou molární hmotností mají různé oblasti použití a také různé fyzikální vlastnosti (např. viskozitu), vzhledem ke vlastnostem řetězců různých délek, jejich chemické vlastnosti jsou skoro stejné. PEO je vysoce hydrofilní, proto neumožňuje adsorpci proteinů a nekontrolovanou adhezi buněk [28].

4.3.5 Polyakrylonitril (PAN)

Polyakrylonitril je syntetická pryskyřice připravená polymerací akrylonitrilu. Vyznačuje se pevností, termoplasticitou, odolností proti rozpouštědlům a chemikáliím, pomalým hořením a nízkou propustností pro plyny. Polyakrylonitril nachází využití především jako náhrada vlny v oděvech a bytových textiliích. V oblasti tkáňového inženýrství nachází uplatnění díky jeho biokompatibilitě. PAN se využívá k výrobě membrán například pro hemodialýzu. Je snaha o jeho modifikaci různými způsoby, například směšováním s chitosanem nebo PEO [29,30,31].

4.3.6 Polyamid 6 (PA6)

Polyamid je syntetický polymer vyráběný kondenzací mezi monomery, kde dochází ke spojení molekul prostřednictvím amidových skupin. Nejčastěji se setkáváme s třemi druhy polyamidů-PA6, PA6,6, PA11. Výchozím materiálem pro vznik polyamidu je ropa. Charakteristickými vlastnostmi materiálu je především vysoká pevnost, odolnost v oděru, pružnost atd. Polyamidová vlákna nacházejí uplatnění převážně v oděvním průmyslu, dále také v technických textiliích. Polyamid 6 nachází uplatnění i v biomedicínských aplikacích pro jeho dobré mechanické a fyzikální vlastnosti, biodegradabilitu a biokompatibilitu. Polyamid 6 se testuje hlavně pro kostní náhrady [32,33].

5 Výroba scaffoldu

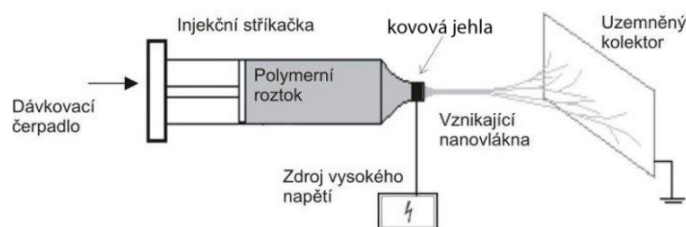
Scaffoldy se vyrábějí několika různými způsoby v závislosti na použitém materiálu a to buď textilní, nebo netextilní technologií. Tato práce se věnuje především textilní technologii výroby scaffoldů s ohledem na pozdější realizaci v laboratoři.

5.1 Textilní technologie

Při výrobě nanovláken se sledují jejich vlastnosti, stejně jako u vláken makroskopických. Mezi tyto vlastnosti patří průměr a délka vláken, porozita, plošná nebo objemová hmotnost, měrná hmotnost a smáčivost. V současnosti je známa celá řada technologických postupů pro výrobu nanovláknenných útvarů.

5.1.1 Elektrostatické zvlákňování

Elektrostatické zvlákňování (elektrospinning) je nejběžněji užívanou metodou zvlákňování. Obrázek 6 a 7 znázorňuje schéma zvlákňování z tyčky a jehly. Technologie se stala populární zejména díky její jednoduchosti a uplatnění v široké škále materiálů jako PCL, PVA, PLLA, PLGA, PEO, kolagen, CS a jiné.



Obr. 6 Elektrostatické zvlákňování z jehly dle [6]

Tato technika umožňuje výrobu polymerních nanovláken v rozsahu 50 - 1000nm. Vlastnosti, které mohou ovlivňovat proces je vodivost, viskozita a povrchové napětí

roztoku, molekulová hmotnost polymeru aj. Mezi proměnné, které můžeme řídit, patří rychlost dávkování polymeru, elektrická intenzita pole, vzdálenost mezi spinnerem a kolektorem, typ spinneru (tyčka, jehla, váleček) aj. Materiály vyrobené elektrostatickým zvlákňováním mají široké využití především v lékařství, farmacii, kosmetickém průmyslu, dále pro filtrace, ochranné oděvy atd. Podstatou technologie je využití elektrostatického pole na elektricky nabitě viskoelastické kapaliny (obvykle roztok polymeru). K tvorbě vláken dochází mezi dvěma opačně nabitými elektrodami, z nichž jedna je v kontaktu s kapalinou, které tak předává část svého náboje. Nabitá kapalina je vystavena přitažlivým elektrostatickým silám opačné elektrody, je k ní tažena a dojde ke vzniku velmi tenkých vláken [34].



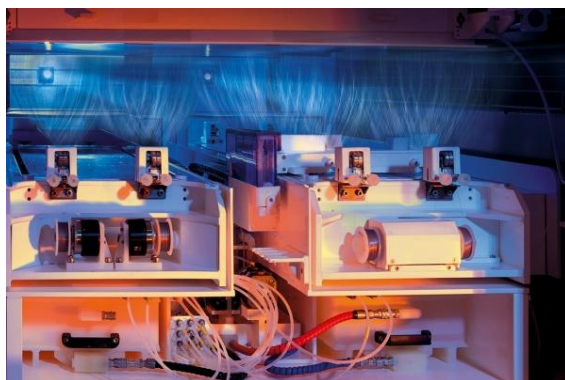
Obr. 7 Elektrostatické zvlákňování z tyčky dle [7]

5.1.2 Nanospider

Nanospider funguje na principu elektrostatického zvlákňování. Díky této technologii je možné vyrábět nanovlákná a nanovláknenné materiály v průmyslovém měřítku. Technologie byla vyvinuta na Technické univerzitě v Liberci, na Katedře netkaných textilií a následně patentována. Partnerem a podporou Technické univerzity v dalším vývoji této technologie se stala společnost Elmarco, která získala licenci na výrobu

a prodej Nanospideru. Již v roce 1959 se zrodila myšlenka první nanotechnologie. Na obrázku 8 můžeme vidět technologii Nanospider přímo v provozu.

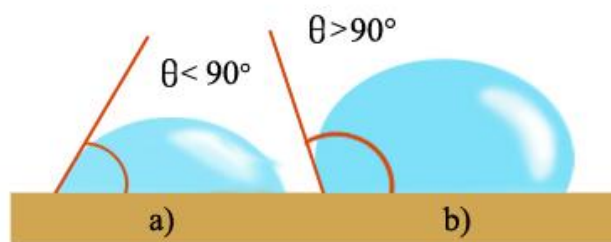
Nanospider dokáže vyrobit vlákna o průměru 100 – 300 nm, to znamená, že vlákna jsou výrazně slabší, než je vlnová délka světla (390 až 760 nm). Nanospider zvládne vyrobit nanovláknennou textilií, jejíž čtvereční metr váží v řádech desítek gramů. Objemnost vláken se dá navolit. Při výrobě nanovláknenné vrstvy se používá podkladový materiál, např. textilie spunbond z polypropylenu (PP). Vláknem nelze vidět pod optickým mikroskopem, viditelné jsou jen jeho shluky, v nichž jsou miliony nanovláken [35].



Obr. 8 Nanospider v provozu dle [8]

6 Smáčivost

Smáčivost je schopnost kapaliny udržovat kontakt s pevným povrchem, vyplývající z mezimolekulární interakce. Stupeň smáčení je určen projevem adhezních a kohezních sil. Koheze je soudržnost molekul vody mezi sebou, zatímco jejich přilnavost vůči pevným povrchům nazýváme adhezí. Je-li soudržnost molekul vody větší než přilnavost k určitému povrchu, jedná se o povrch nesmáčivý. V praxi to znamená, že kontaktní úhel na tomto povrchu je větší než 90° . Pokud je adheze větší než koheze označujeme povrch za smáčivý. Kontaktní úhel je v tomto případě menší než 90° . Jestliže se použije k testování voda, potom mluvíme o hydrofilním, případně hydrofobním povrchu [36]. Na obrázku 9 je znázorněno schéma úhlu smáčení vzhledem k povrchu.



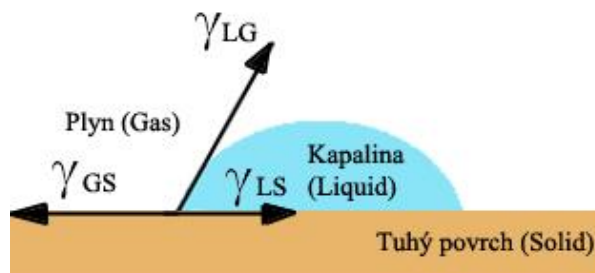
Obr. 9 Úhel smáčení: a) hydrofilní materiál,
b) hydrofobní materiál

- $\theta < 90^\circ$ - povrch pevné látky je (neúplně) smáčen
- $\theta > 90^\circ$ - povrch tělesa se nesmáčí

6.1 Úhel smáčení, Youngova rovnice

Úhel smáčení je mírou smáčení kapaliny na pevném povrchu. Tento úhel svírá tečna k povrchu kapky, vedená v bodě styku kapky s rozhraním. Charakteristika tvaru kapky

kapaliny na povrchu nerozpustné pevné látky je závislá na vlastnostech mezifázového rozhraní.



Obr. 10 Kapka kapaliny umístěná na rovinném povrchu. Je zde vyznačena rovnováha sil povrchového napětí na obvodu smáčení. G značí plyn (gas), L kapalinu (liquid) a S pevnou látku (solid)

Na obrázku 10 můžeme vidět, že v soustavě existují tři různé stykové plochy na rozhraní fází mezi pevná látka – plyn, kapalina – plyn a kapalina – pevná látka. Každému mezifázovému rozhraní odpovídá příslušné povrchové napětí γ_{LS} (kapalina – pevná látka), γ_{GS} (plyn – pevná látka) a γ_{LG} (kapalina – plyn). Křivka, ve které se stýkají všechna fázová rozhraní, se nazývá linie smáčení. Úhel θ , který leží mezi mezifázovými rozhraními kapalina – pevná látka a kapalina – plyn se nazývá úhel smáčení.

Rovnovážný vztah mezi úhlem smáčení θ a jednotlivými mezifázovými rozhraními je dán Youngovou rovnicí:

$$\gamma_{GS} - \gamma_{LS} - \gamma_{LG} \cdot \cos \theta = 0 \quad (1)$$

nebo

$$\cos \theta = \frac{\gamma_{GS} - \gamma_{LS}}{\gamma_{LG}} \quad (2)$$

Tento tvar rovnice předpokládá ideálně hladký homogenní povrch[37].

Mezním případem je situace, kdy $\theta = 0$, pak se nazývá „dokonalé smáčení“ a má tvar:

$$\gamma_{GS} = \gamma_{LS} + \gamma_{LG} \quad (3)$$

6.2 Vliv smáčivosti materiálu na buněčnou adhezi

Je známo, že smáčivost scaffoldu je jednou z nejdůležitějších vlastností. Mnoho studií prokázalo, že mírně hydrofilní povrchy mají příznivý vliv na buněčnou adhezi a růst. Naopak hydrofobní povrchy vykazují pro adhezi a růst buněk nepříznivé podmínky. Adsorbce molekul nastává ve výhodné geometrické *konformaci*⁷, molekuly jsou dobře přístupné receptorům buněčné adheze – např. integrinům. Extrémně hydrofilní povrchy zabraňují adsorpci bílkovin, nebo jsou vázány tyto molekuly velmi slabě. To by mohlo vést k oddělení těchto molekul hlavně v pozdějších intervalech biologického testování, kdy se na povrch váže velké množství buněk. Naopak na vysoce hydrofobní povrchy jsou bílkoviny adsorbovány v *denaturované formě*⁸. Jejich geometrická konformace je nevhodná pro adhezi buňky na materiál, jelikož molekuly jsou málo přístupné pro receptory buněčné adheze [38, 39].

6.3 Měření smáčivosti materiálu

Kontaktní úhel smáčení je jednou z mála přímo měřitelných vlastností fázového rozhraní pevná látka/kapalina/plyn. Tato metoda měření zkoumá sedící kapku kapaliny na pevném podkladu. Je to jednoduchá, rychlá a levná metoda charakterizace pevných materiálů. Na základě zjištěného kontaktního úhlu lze vypočítat povrchovou energii daného materiálu. Tato metoda počítá s naprosto hladkým a čistým povrchem. Proto při měření kontaktního úhlu u polymerních scaffoldů může dojít k chybě či zkreslení výsledků. Při běžném měření musí být podložní film maximálně vodorovný, aby nedocházelo ke zkreslení vlivem gravitace. V této práci jde především o to zjistit, zda má smáčivost polymerního materiálu vliv na adhezi a proliferaci buněk. Měření se provádí stanovením úhlu, který svírá tečna k povrchu kapky vedená v bodě styku kapky s rozhraním [40].

⁷ Tento termín označuje různá uspořádání molekul jedné sloučeniny.

⁸ Bílkovina ztrácí svou biologickou aktivitu.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

7 Výroba scaffoldů

V kapitole jsou popsány zařízení použitá k výrobě scaffoldů. Následně jsou uvedeny postupy přípravy jednotlivých roztoků polymerů a způsob, jakým byly vyrobeny. K postupům jsou přidány snímky scaffoldů z rastrovacího elektronového mikroskopu (SEM) při různých zvětšeních.

7.1 Použitá zařízení

7.1.1 Nanospider - NS Production Lines 500

Produkční linka NS 1WS500U je nejmenším produkčním zařízením pro maloobjemovou výrobu sloužící k aplikovanému výzkumu. Zařízení firmy Elmarco umožňuje výměnu elektrodového systému (statická struna, rotační struna, rotační válec) a tím zvláknovat polymery vodou rozpustné i nerozpustné. Nanospider je univerzální zařízení pro výrobu nanovláknenného materiálu. Procesní data jsou sledována a následně podrobena analýze pomocí PC.

7.1.2 Elektrostatické zvláknování ze stříkačky (trysky), systém dvou jehel, zvláknování z tyčky

Základní zařízení elektrospinningu je tvořeno:

- zdrojem vysokého napětí (řádově v rozsahu desítek kV)
- nabíjenou a zemnicí elektrodou
- sběrným zařízením - kolektorem
- dávkovací injekční stříkačkou s jehlou (tryskou)

Pro rychlejší zvlákňování některých těžko zvláknitelných materiálů např. směsi PCL + CS může být použit systém dvou nebo čtyř jehel. Z téhož důvodu může být za určitých podmínek polymer zvlákňován z tyčky.

Injekční stříkačka naplněná polymerním roztokem je připevněna v dávkovacím zařízení. Na přístroji se navolí počet mililitrů roztoku ve stříkačce a rychlost průtoku za hodinu.

K experimentu byl použit přístroj Syringe pumpe od firmy KD Scientific. Injekční pumpa je automatizovaná pro dodávku tekutiny či plynu v laboratorním prostředí. Na obrázku 11 je zachycena laboratorní výroba scaffoldu.



Obr. 11 Zvlákňování z trysky, systém čtyř jehel

7.1.3 UV lampa Noblelight Heraeus 200F

Síťování polymeru z PVP probíhalo za dusíkové atmosféry pod UV deuteriovou lampou Noblelight Heraeus 200F. Pro nadměrnou tvorbu tepla při provozu bylo nutné přístroj chladit. Deuteriová lampa je zdrojem vysokoenergetického ultrafialového záření se spektrálním rozsahem od 160 nm do 400 nm. Lampa dosahuje největšího výkonu kolem 200 nm. Těmto podmínkám byl vzorek vystaven po dobu čtyřiceti minut.

Rastrovací elektronová mikroskopie

Snímky byly pořízeny na rastrovacím elektronovém mikroskopu značky FEI COMPANY PHENOM, který umožňuje plasticky zobrazit vláknennou strukturu materiálu a adherované buňky. Vzorky byly před vložením do mikroskopu potaženy tenkou vrstvou zlata.

7.2 Zvlákňování polymerů

K testování byly použity následující materiály: PVA, PCL, PA6, PAN, PVP, PCL + CS, CA a rybí želatina. Scaffoldy byly zvlákňovány na netkanou spunbond vrstvu o plošné hmotnosti $6,775\text{g/m}^2$ nebo $6,035\text{g/m}^2$. V tabulce 1 je uveden přehledný popis rozpouštědlových systémů a způsobu výroby scaffoldů.

Tab. 1 Přehled rozpouštědlových systémů a způsobu zvlákňování scaffoldů

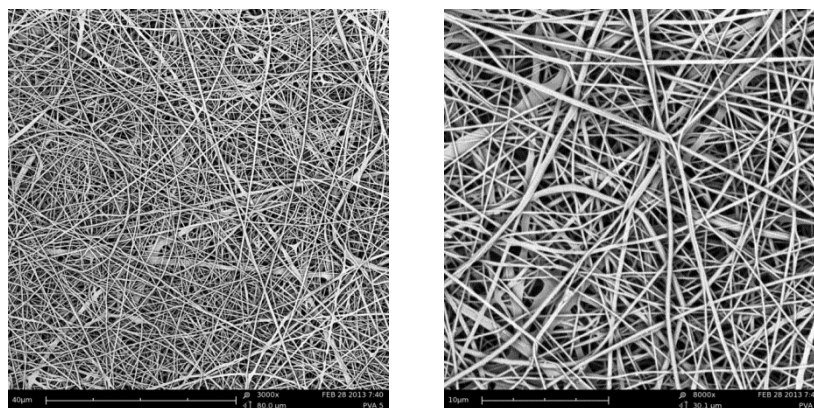
Název polymeru	Rozpouštědlový systém	Typ zvlákňování
PVA	14% vodný roztok PVA, síťovací činidla kys. fosforečná + glyoxal	Elektrostatické zvlákňování ze struny, Nanospider
PCL	18% roztok PCL, rozpouštědlový systém chloroform/etanol, poměr 8:2	Elektrostatické zvlákňování ze struny, Nanospider
PVP	30% roztok PVP, rozpouštědlo etanol	Elektrostatické zvlákňování ze struny, Nanospider
PA6	13% roztok PA6, rozpouštědlový systém kys. octová/kys. mravenčí, poměr 2:1	Elektrostatické zvlákňování ze struny, Nanospider
PAN	15% roztok PAN, rozpouštědlo DMF	Elektrostatické zvlákňování ze struny, Nanospider

Blend PCL + CS	10%PCL + 8%CS, 12%PCL + 6%CS, 14%PCL + 4%CS, rozpouštědlový systém kys. mravenčí/ kys.octová, poměr 7:3	Elektrostatické zvlákňování ze stříkačky, systém dvou jehel
PEO	5% a 8% vodný roztok	Elektrostatické zvlákňování ze stříkačky
CA	10% roztok CA, rozpouštědlo dimetylacetamid	Elektrostatické zvlákňování ze stříkačky
Rybí želatina	14% vodný roztok želatiny, síťovací činidlo GTA	Elektrostatické zvlákňování z tyčky

PVA

14% vodný roztok PVA od firmy NOVÁKI s molekulovou hmotností (Mn) 60 000 byl elektrostaticky zvlákňován ze struny na laboratorním přístroji Nanospider.

Aby nedocházelo k rozpouštění scaffoldu v kapalinách, byly do roztoku přidány síťovací činidla, konkrétně 85% kyselina fosforečná a glyoxal. Dále vzniklý materiál prošel zahříváním v 135° po dobu 4-5min. Na snímcích na obr. 12 z SEM můžeme vidět shluk vláken téměř bez defektů.

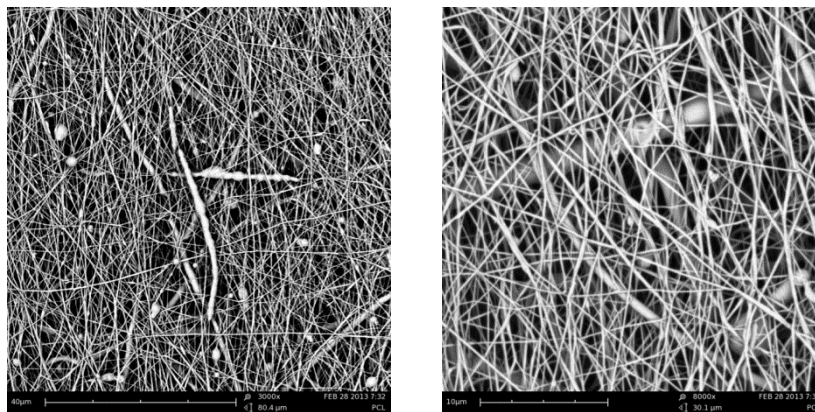


Obr. 12 PVA 3000x a 8000x zvětšeno

PCL

18% roztok PCL s molekulovou hmotností 45 000 vyroben firmou SIGMA -ALDRICH byl zvlákněn ze struny na přístroji Nanospider. PCL byl rozpouštěn v systému chloroform/etanol v poměru 8:2.

Na snímcích scaffoldu na obr.13 z PCL pořízených na SEM jsou místy zřetelné defekty. Defekty mají v tomto případě podobu silnějších vláken nepravidelného tvaru.

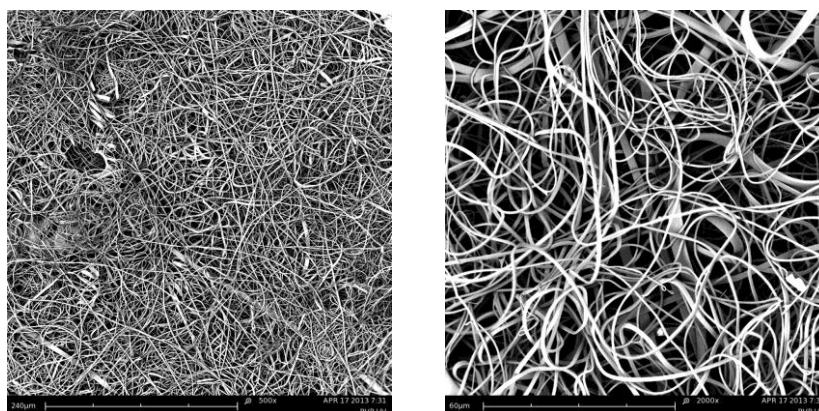


Obr. 13 PCL 3000x a 8000x zvětšeno

PVP

V experimentu byla použita koncentrace 30% PVP od firmy SIGMA-ALDRICH. PVP byl rozpouštěn v etanolu a následně zvlákněn ze struny na přístroji Nanospider. Materiál byl pro jeho rozpustnost ve vodě síťován UV zářením o vlnové délce 200nm po dobu 45min. Scaffold byl poskytnut Bc. Alešem Šamanem v rámci diplomové práce Studium použití polyvinylpyrrolidonu pro tkáňové inženýrství.

Ze snímků scaffoldu z PVP na obr. 14 můžeme zejména při větším zvětšení pozorovat jiné chování vláken než u předchozích materiálů. Vlákná jsou zkroucená a tvoří spleť s dalšími vlákny.

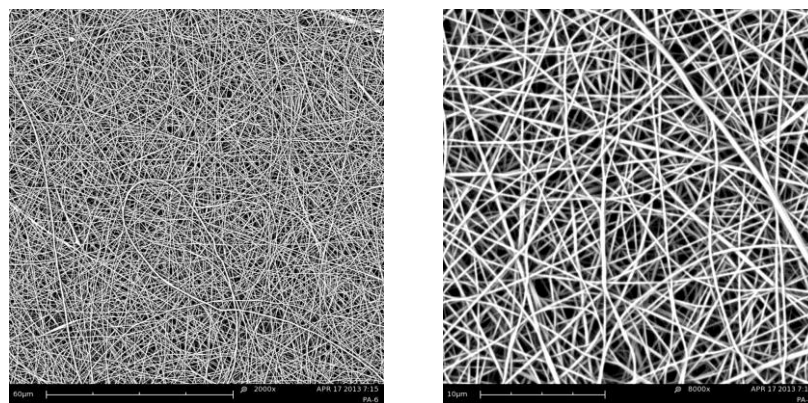


Obr. 14 PVP 500x a 2000x zvětšeno

PA6

Roztok obsahoval 13% polyamidu od firmy ULTRAMID B27. Rozpouštědlovým systémem byla směs kyseliny octové a kyseliny mravenčí v poměru 2:1. Zvlákňování bylo prováděno ze struny na přístroji Nanospider.

Na snímcích scaffoldu z PA6 na obr. 15 nejsou zřetelné žádné defekty.

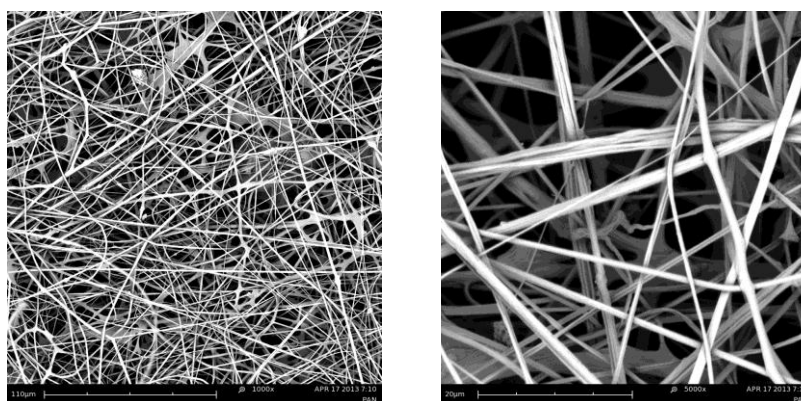


Obr. 15 PA6 2000x a 8000x zvětšeno

PAN

15% roztok polyakrylonitrilu s molekulovou hmotností 150 000 od firmy SIGMA-ALDRICH byl rozpuštěn v DMF. Elektrostatické zvlákňování probíhalo ze struny na přístroji Nanospider.

Ze snímků na obr. 16 je zřejmé, že vlákna scaffoldu z PAN mají větší průměr než např. PCL, PVA a směsi PCL + CS.

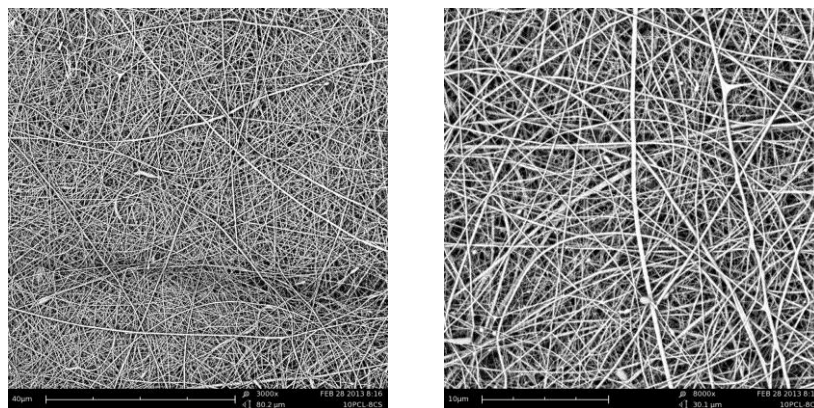


Obr. 16 PAN 1000x a 5000x zvětšeno

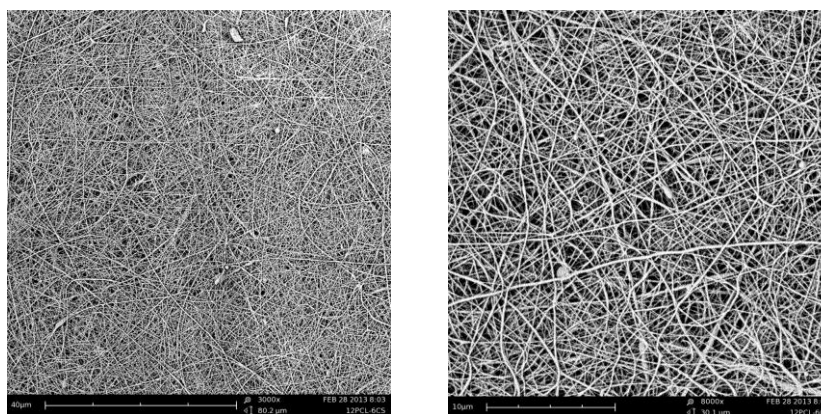
BLEND PCL + CS

Roztoky byly připraveny v různých poměrech: 10%PCL + 8%CS, 12%PCL + 6%CS, 14%PCL + 4%CS v rozpouštědlovém systému kyseliny mravenčí a kyseliny octové v poměru 7:3. PCL bylo zakoupeno od firmy SIGMA-ALDRICH, chitosan od firmy Wako. Roztok PCL a CS je nerozpustný ve vodě za předpokladu, že má voda hodnotu pH větší než 6. Materiál byl vyroben elektrostatickým zvlákňováním, pro urychlení procesu zvlákňování se použil systém dvou jehel. Materiál byl dodán Bc. Marií Peškovou v rámci diplomové práce Elektrostatické zvlákňování směsi polykaprolaktonu a chitosanu a jeho biologické testování.

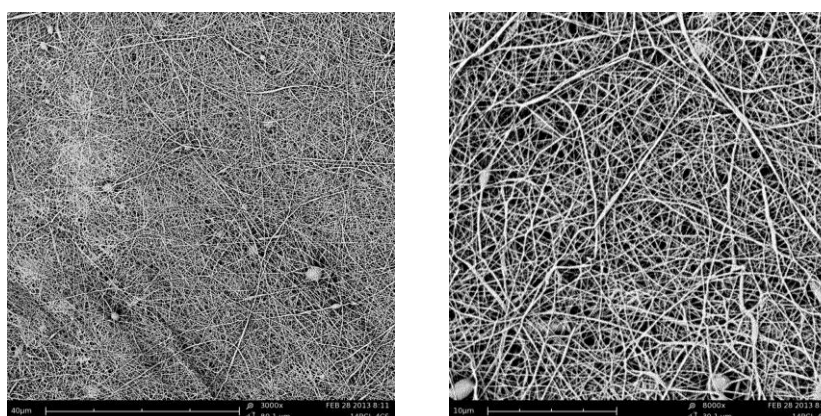
Na snímcích na obr.17, 18 a 19 můžeme vidět různé poměry PCL + CS. Materiály téměř neobsahují defekty.



Obr. 17 10%PCL + 8%CS 3000x a 8000x zvětšeno



Obr. 18 12%PCL + 6%CS 3000x a 8000x zvětšeno

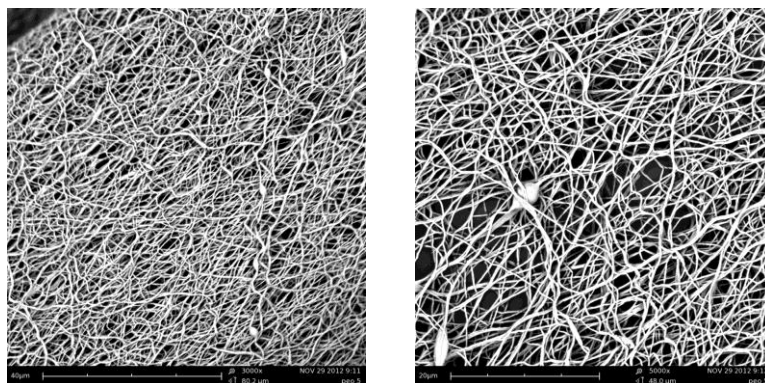


Obr. 19 14%PCL + 4%CS 3000x a 8000x zvětšeno

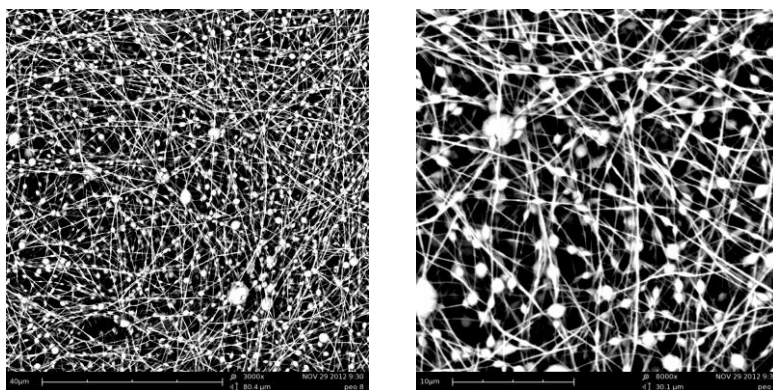
PEO

Připraveny byly dva vodné roztoky polyethylenoxidu firmy SIGMA-ALDRICH s koncentrací 5% a molekulovou hmotností 400 000, dále s koncentrací 8% a molekulovou hmotností 200 000. Roztoky byly zvlákněny elektrostatickým zvlákněním z jehly. Roztok PEO je rozpustný ve vodě, proto je zapotřebí scaffold síťovat např. UV zářením. Proces síťování by byl časově i technicky náročný, proto se materiál dále netestoval.

Na snímcích scaffoldu z 5% PEO na obr. 20 vidíme téměř čistý povrch bez defektů. Naopak na obr. 21 obsahoval scaffold z 8% PEO velké množství kuličkových defektů.



Obr. 20 PEO 5% 3000x a 5000x zvětšeno



Obr. 21 PEO 8% 3000x a 8000x zvětšeno

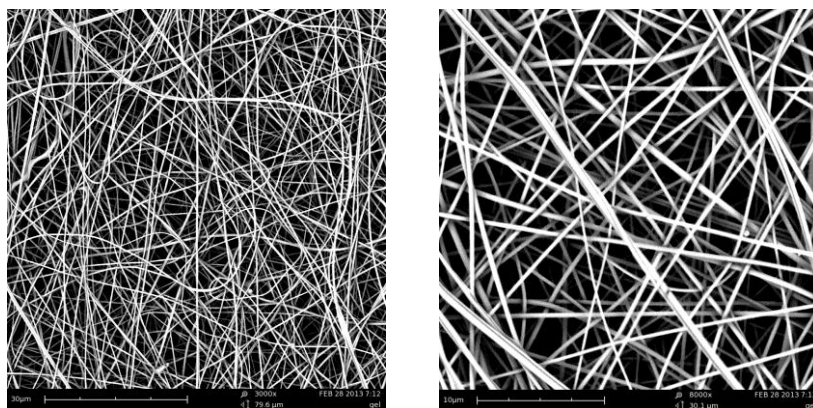
CA- acetát celulózy

Roztok acetátu celulózy s koncentrací 10% a molekulovou hmotností 50 000 od firmy SIGMA-ALDRICH byl zvlákněn elektrostatickým zvlákněním z trysky. Jako rozpouštědlo byl použit dimetylacetamid. Pokus o zvláknění se nezdařil, vlákna se nevytvářela ani při změně průtoku, napětí a průměru jehly.

Želatina

14% vodný roztok rybí želatiny byl zvlákněn elektrostatickým zvlákněním z tyčky. Tímto způsobem bylo zvláknění mnohonásobně urychleno. Želatina z rybí kůže byla vyrobena firmou SIGMA-ALDRICH. Roztok želatiny byl rozpustný ve vodě, proto bylo použito síťovací činidlo. Po přidání 1% GTA do roztoku došlo ke 100% zesítnění. Roztok změnil svou strukturu a nebylo jej možno zvláknovat. Z tohoto důvodu se přistoupilo k metodě síťování v parách GTA. Vyrobený scaffold se vložil do exsikátoru a byl vystaven parám GTA (podkapitola 1.2.1).

Snímky scaffoldu z rybí želatiny na obr. 22 nevykazují žádné defekty.



Obr. 22 Želatina 3000x a 8000x zvětšeno

7.2.1 Proces síťování želatiny

Při výrobě scaffoldů nastala otázka, jak síťovat jinak ve vodě rozpustnou želatinu. Na základě článku *Crosslinking of the electrospun gelatin nanofibers* byla použita metoda síťování v parách stoprocentního GTA. Stoprocentní GTA nevypařuje vodu, a tudíž nedochází ke srážení scaffoldu a změny jeho struktury na fólii[41]. V laboratořích nebyl k dispozici vysokoprocentní GTA, proto byl použit 25% GTA. To vedlo k experimentům, kde by byly v ideálním případě absorbovány všechny vodní páry. K experimentu byl použit exsikátor, který umožňuje síťování v parách díky své uzavřené atmosféře.

1. Experiment

Dno exsikátoru bylo pokryto 4ml 25% GTA. Testovaný vzorek byl položen přímo na keramickou destičku a pozorován po dobu jedné hodiny a po 48 hodinách.

Vyhodnocení:

Testovaný vzorek po jedné hodině v exsikátoru téměř nezměnil barvu, ale jeho struktura se zborčila. Po 48 hodinách se vzorek scaffoldu zbarvil do oranžova, z materiálu se stala fólie.

2. Experiment

Dno exsikátoru bylo pokryto 4ml 25% GTA. Na keramickou destičku byla položena netkaná textilie typu spunbond a poté silikagel, který zastával funkci absorbentu vodních par. Na silikagel byl umístěn vzorek scaffoldu, který byl pozorován po dobu jedné hodiny a po 48 hodinách v exsikátoru.

Vyhodnocení:

Testovaný vzorek scaffoldu nezměnil po jedné hodině barvu ani svou velikost. Po 48 hodinách v exsikátoru se vzorek na pohled nezměnil. Byl vyjmut a vložen do kádinky s vodou, aby se otestovala jeho rozpustnost ve vodě. Testovaný vzorek se ihned rozpustil, nedošlo tedy k zesítnění.

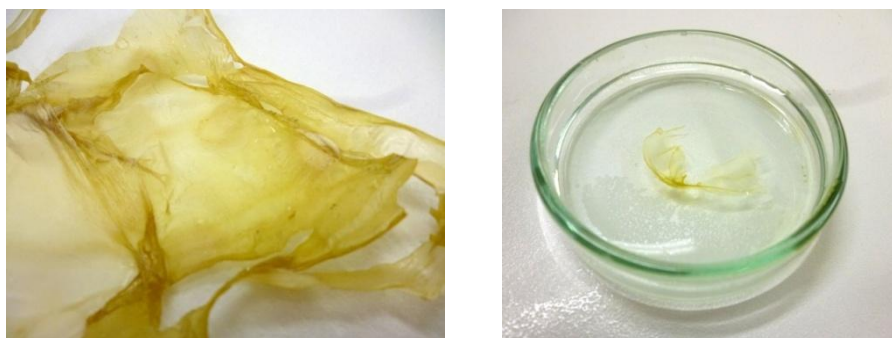
3. Experiment

Dno exsikátoru bylo pokryto 4ml 25% GTA. Na keramickou destičku byla položena netkaná textilie typu spunbond s vrstvou hydrofilního PVA. Na tento materiál byl umístěn testovaný vzorek scaffoldu, který byl pozorován po dobu jedné hodiny a po 48 hodinách.

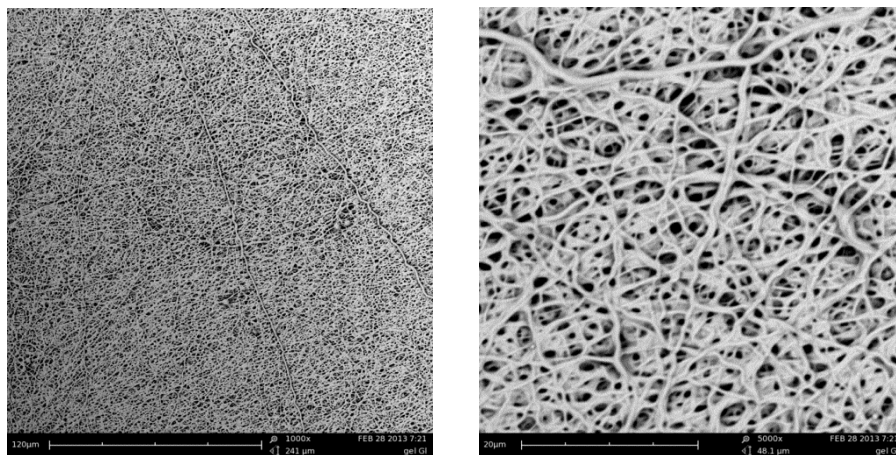
Vyhodnocení:

Testovaný vzorek scaffoldu se po jedné hodině mírně srazil. Po 48 hodinách v exsikátoru se vzorek několikanásobně zmenšil a získal výrazně oranžovou barvu. Z pouhého pohledu je znát změna struktury materiálu.

Snímek na obrázku 23 byl pořízen z prvního experimentu. Vlivem vodních par nastalo zborcení struktury želatiny na fólii, působením par GTA došlo k zesítnění vzorku. Změna struktury scaffoldu je patrná ze snímku 24 pořízený na SEM. Želatina nebyla dále biologicky testována. Pro pozitivní výsledek síťování by bylo zapotřebí 100% GTA nebo nižší koncentrace s dobrým absorbentem vodních par. Dále by mohl být použit jiný síťovací prostředek například ethylendichlorid.



Obr. 23 Zesíťovaná želatinová fólie



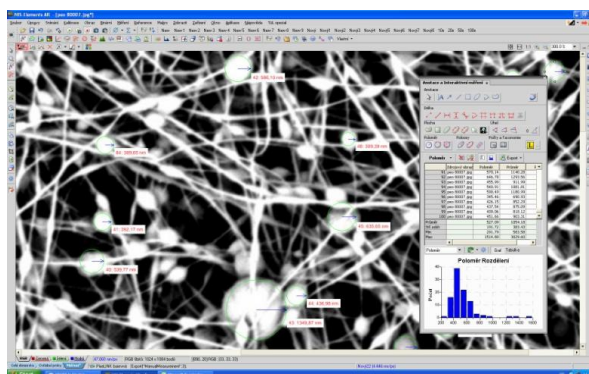
Obr. 24 Zesíťovaná želatina 1000x a 5000x zvětšeno

8 Analýza vlákenného materiálu - scaffoldu

8.1 Použitá zařízení

8.1.1 Software pro měření průměru vláken

Průměry vláken a kuličkových defektů byly změřeny v softwarovém zařízení NIS-Elements 3.2 pro obrazovou analýzu. Bylo provedeno celkem sto měření. Hodnoty se následně převedly do programu Microsoft Excel, kde byly vypočteny základní charakteristiky-aritmetický průměr a směrodatná odchylka. Na obrázku 25 je vidět proces měření těchto dat v programu Nis elements 3.2.



Obr. 25 Nis Elements 3.2.

8.1.2 Měření průměru vláken

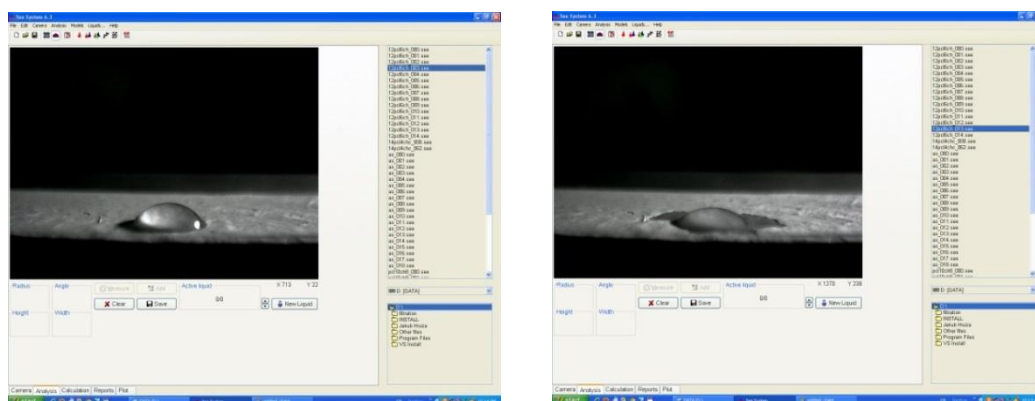
Na testovaných materiálech bylo provedeno měření průměru vláken. Po změření jednoho sta vláken byl získán průměr, směrodatná odchylka a maximální či minimální průměr měřeného vlákna, které můžeme vidět v tabulce 2. Grafy a snímky vláken z těchto měření se nacházejí v příloze.

Tab. 2 Statistické ukazatele měření průměrů vláken scaffoldů

Statistické ukazatele	Výsledky měření	Statistické ukazatele	Výsledky měření
	PVA		12%PCL+6%CS
Aritmetický průměr[nm]	245,04	Aritmetický průměr[nm]	111,39
Směrodatná odchylka[nm]	81,01	Směrodatná odchylka[nm]	28,99
Minimum [nm]	113,73	Minimum [nm]	67,52
Maximum [nm]	442,46	Maximum [nm]	198,91
	PCL		14%PCL+4%CS
Aritmetický průměr[nm]	245,04	Aritmetický průměr[nm]	96,52
Směrodatná odchylka[nm]	81,01	Směrodatná odchylka[nm]	24,22
Minimum [nm]	113,73	Minimum [nm]	50,53
Maximum [nm]	442,46	Maximum [nm]	182,94
	PA6		5%PEO
Aritmetický průměr[nm]	229,65	Aritmetický průměr[nm]	222,68
Směrodatná odchylka[nm]	59,28	Směrodatná odchylka[nm]	58,43
Minimum [nm]	106,98	Minimum [nm]	111,61
Maximum [nm]	456,17	Maximum [nm]	448,73
	PAN		8%PEO
Aritmetický průměr[nm]	1421,79	Aritmetický průměr[nm]	155,26
Směrodatná odchylka[nm]	453,96	Směrodatná odchylka[nm]	41,47
Minimum [nm]	684,85	Minimum [nm]	71,81
Maximum [nm]	2837,84	Maximum [nm]	266,34
	Želatina	Průměr defektů	8%PEO
Aritmetický průměr[nm]	328,46	Aritmetický průměr[nm]	527,09
Směrodatná odchylka[nm]	85,49	Směrodatná odchylka[nm]	191,72
Minimum [nm]	141,18	Minimum [nm]	291,79
Maximum [nm]	514,57	Maximum [nm]	1514,8
	10%PCL+8%CS		PVP
Aritmetický průměr[nm]	115,89	Aritmetický průměr[nm]	1328,69
Směrodatná odchylka[nm]	26,87	Směrodatná odchylka[nm]	779,29
Minimum [nm]	64,69	Minimum [nm]	385,13
Maximum [nm]	217,61	Maximum [nm]	4355,2

8.1.3 Zařízení a software pro měření kontaktního úhlu

Surface Energy Evaluation System je název přístroje a softwaru, který slouží k měření kontaktního úhlu sedící kapky na zkoumaném vzorku. Zařízení disponuje CCD kamerou a stolkem s posuvem. Je připojené pomocí USB portu k počítači. Pro měření je zapotřebí malý vzorek o velikosti několika čtverečních centimetrů, který se umístí před čočku kamery. Za pomoci mikropipety je na vzorek umístěna kapka testovací kapaliny. SeeSystem okamžitě pořídí snímek profilu kapky (obr.26). Poté dochází k výpočtu na základě jednoduché interpolace šířky oblouku opisujícího tvar kapky. Software umožňuje ukládání obrázků, zachycení časového vývoje profilu kapky, provedení výpočtu povrchové energie vzorku na základě různých výpočetních modelů atd.



Obr. 26 Snímky profilu kapky z programu SeeSystem

8.1.4 Měření kontaktního úhlu scaffoldů

Měření kontaktního úhlu bylo prováděno metodou sedící kapky (viz. podkapitola 2.1.2.). Záznamy v tabulce 3 odpovídají smáčivosti směsi PCL + CS. U těchto materiálů nejde o princip sedící kapky, jelikož se do pevného povrchu vsakuje a dochází k tzv. vzlínání. Graf znázorňuje dynamiku kapky neboli velikost kontaktního úhlu v závislosti na čase. Kapka kapaliny (vody) byla sledována po dobu 180 sekund. Kapka vody na čistém PCL byla neměnná, proto byl kontaktní úhel změřen na pěti různých místech

vzorku a poté byl vypočten aritmetický průměr hodnot (tab. 4). Další testované materiály – PVA, PVP, PAN a PA6 byly extrémně hydrofilní, tzn., že jejich kontaktní úhly nemohly být změřeny. Rychlost vsáknutí do polymeru byla okamžitá. Materiály byly měřeny bez spodní spundbond vrstvy, která ovlivňuje smáčivost materiálu.

Tab. 3 Smáčivost PCL + CS

	10%PCL+8%CS	12%PCL+6%CS	14%PCL+4%CS
1sek.	60°	65°	78°
10sek.	60°	60°	62°
20sek.	57°	60°	60°
30sek.	56°	60°	57°
40sek.	56°	60°	56°
50sek.	56°	60°	54°
60sek.	53°	57°	50°
120sek.	44°	50°	35°
180sek.	44°	43°	22°

Tab. 4 Smáčivost PCL

	PCL
1. měření	114,9°
2. měření	116,4°
3. měření	119,6°
4. měření	108,7°
5. měření	118,5°
Průměr	115,62°

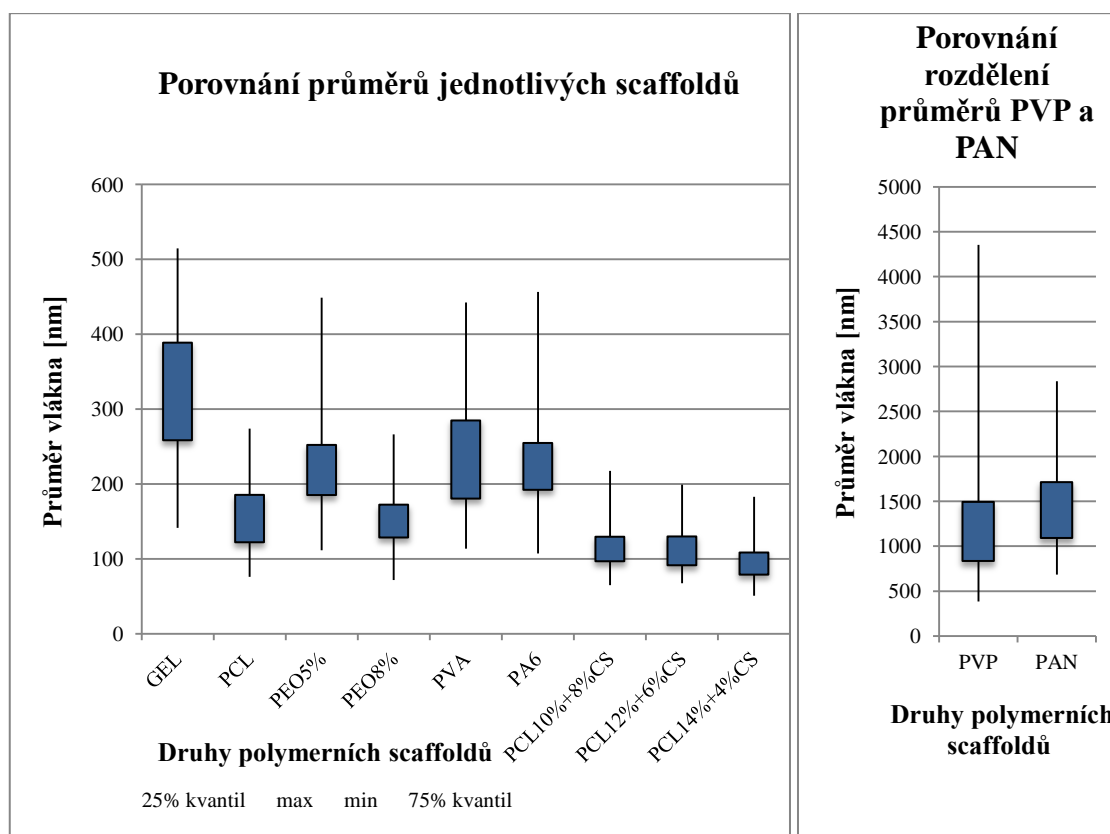
8.1.5 Zjišťování změny struktury vrstev po smáčení v H₂O a ETOH

Před začátkem biologického testování byly jednotlivé scaffoldy ponořeny do vody a ethanolu. Tento experiment měl vést ke zjištění, zda tyto kapaliny ovlivní strukturu

materiálu. Vzorčky velikosti 15x15mm byly vloženy do 2ml kapaliny, kdy byly ponechány působení 30minut. Po vysušení materiálu byly provedeny snímky na SEM. Snímky z mikroskopu se nacházejí v příloze.

8.2 Výsledky analýzy scaffoldů a diskuze

8.2.1 Měření průměru vláken scaffoldů



Obr. 27 Porovnání rozdělení průměrů vláken jednotlivých scaffoldů a porovnání rozdělení průměrů PVP a PAN

Jak je vidět z prvního krabicového grafu v obr. 27, průměry vláken většiny testovaných scaffoldů se pohybují v rozmezí 50-515nm. Nejslabší vlákna má scaffold z 14% PCL + 4%CS, naopak nejsilnější vlákna obsahuje želatina. Druhý graf znázorňuje rozdělení PVP a PAN mimo ostatní materiály proto, že jsou jejich průměry

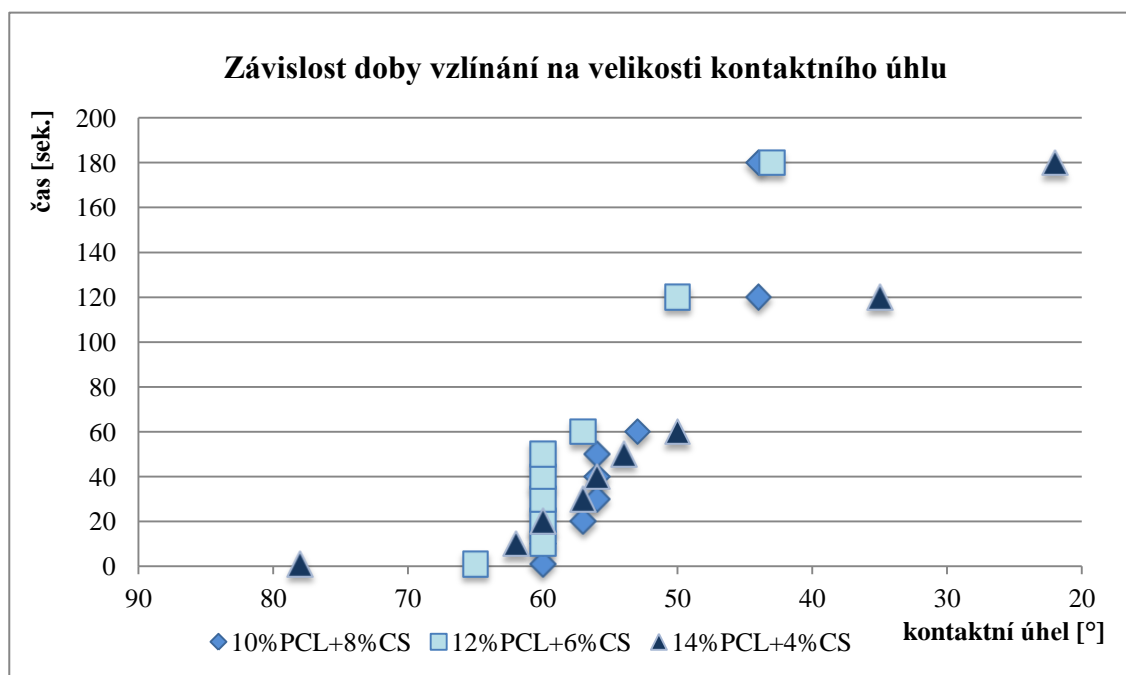
vláken mnohonásobně větší. Jako extrémní hodnoty by v grafu zkreslovaly ostatní data materiálů.

Velikost průměru vláken hraje velkou roli při adhezi a proliferaci buněk. S jistotou můžeme říci, že je pro buňky výhodné prostředí s velikostí průměrů vláken v řádech nanometrů. Buněčnou adhezi a proliferaci ovlivňují kromě smáčivosti materiálu a průměru vláken další vlastnosti, např. polarita povrchu a parametry drsnosti. Výška, hloubka, ale i tvar nerovností (ostrost) může vést k mechanickému poškození buněk[2].

8.2.2 Měření kontaktního úhlu scaffoldů

Z výsledků můžeme konstatovat, že čtyři z osmi testovaných scaffoldů (PVA, PVP, PA6, PAN) jsou extrémně hydrofilní. U těchto materiálů nejde změřit kontaktní úhel. Jediným testovaným hydrofobním materiálem v této práci je čistý polykaprolakton, jehož průměr z pěti měření činí $115,6^\circ$. Jak bylo řečeno výše, úhel smáčení povrchu větší než 90° by neměl umožňovat optimální adhezi a proliferaci buněk a tím omezuje aplikaci scaffoldu ve tkáňovém inženýrství. Pro snížení kontaktního úhlu byl využit chitosan. Scaffoldy vyrobené ze směsi PCL+CS jsou podle očekávání hydrofilní. Jejich míra hydrofility nejde přesně určit, jelikož kapka na povrchu materiálu není neměnná. Předpoklad, že se vzrůstajícím množstvím chitosanu v roztoku poroste také kontaktní úhel, se nepotvrdil[4, 42].

Na obrázku 28 je v grafu zaznamenána doba vzlínání hydrofilních scaffoldů. To znamená, že se velikost kapky vody na materiálu měnila v čase. Vzlinavost byla měřena po dobu 180 sec. Hodnoty u scaffoldu ze směsi 10%PCL + 8%CS a 12%PCL + 6%CS jsou podobné. V průběhu 180 sec. klesnul kontaktní úhel mezi kapkou a prvním materiálem o 16° , zatímco u druhého materiálu o 22° . Výraznější změna nastala u scaffoldu ze směsi 14%PCL + 4%CS. V průběhu 180 sec. klesnul kontaktní úhel o 58° .



Obr. 28 Závislost doby vztlínání na velikosti kontaktního úhlu

8.2.3 Výsledky z porovnávání vzorků po smočení ve vodě a v ethanolu

Ze snímků pořízených na rastrovacím elektronovém mikroskopu lze vidět, že některé polymerní materiály podstatně změnily svou strukturu. Vlákná na scaffoldu z PVA jsou po promytí vodou i ethanolem téměř neznatelná, slily se do souvislé vrstvy. To může mít vliv při biologickém testování. Další scaffoldy, které se viditelně změnily, jsou směsi PCL s chitosanem. Jelikož čistý PCL po promytí vůbec nezměnil svou strukturu, tento jev mají zřejmě za následek chitosanová vlákna. Povrch vzorku PVP zaznamenal viditelnou změnu struktury materiálu. Na scaffoldy z PA6 a PAN promývání nemělo žádný vliv. Snímky jsou k vidění v příloze diplomové práce.

9 Biologické testování tkáňových nosičů *in-vitro*

9.1 Osazení polymerních scaffoldů

9.1.1 Použité buňky

Pro biologické testování polymerních scaffoldů byly použity myší 3T3 fibroblasty (ATCC, USA), 10. Pasáž.

9.1.2 Použité chemikálie

- DMEM – firma Lonza
- MTT – firma Sigma-Aldrich chemistry
- PBS – firma Lonza
- FBS – firma Lonza
- Antibiotika penicilin/streptomycin/amfotericin B – firma Lonza
- Methanol – firma Penta
- Ethanol – firma Penta
- Propidium jodid - firma Sigma-Aldrich chemistry
- Isopropanol – firma Penta
- EDTA/Trypsin - firma Sigma-Aldrich chemistry
- Glutaraldehyd – firma Sigma-Aldrich chemistry

9.2 Použitá zařízení

9.2.1 Bürkerova komůrka

Komůrka slouží ke stanovení počtu buněk v suspenzi. Počítání se provádí v políčkách, která jsou patrná pod mikroskopem a mají definovanou velikost.

9.2.2 Spektrofotometr

Pro zhodnocení viability buněk pomocí MTT testu byl použit spektrofotometr od firmy BioTek typu ELx808. Všechny výpočty jsou prováděny automaticky, vyhodnocování dat je provedeno pomocí řídicího a analytického softwaru Gen5.

9.2.3 Invertovaný fluorescenční mikroskop

Pro získání snímků byl použit invertovaný fluorescenční mikroskop NIB- 100F. Pomocí této metody byl získán přehled o rozmístění buněčné populace na scaffoldu. Snímky fluorescence buněk byly zachyceny pomocí programu Scope Image Plus.

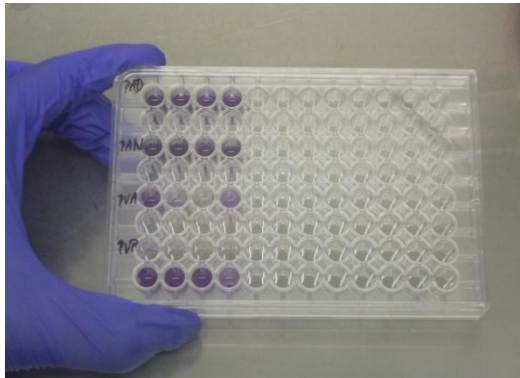
9.2.4 Rastrovací elektronový mikroskop - SEM

Snímky byly pořízeny na rastrovacím elektronovém mikroskopu značky FEI COMPANY PHENOM, který umožňuje plasticky zobrazit vláknennou strukturu materiálu a adherované buňky.

9.3 Použité metody

9.3.1 MTT test

Test MTT je kolorimetrický test pro měření aktivity buněčných enzymů. Metoda je založena na redukci žlutého solubilního 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu (MTT) na nerozpustný formazan (fialové krystaly hvězdčovitěho tvaru). Reakce probíhá na mitochondriální membráně živých buněk. Formazan se rozpustí přidáním silného detergentu, v tomto případě isopropanolu. Zabarvení se vyhodnocuje spektrofotometricky. Hodnota absorbance roztoku odpovídá hodnotě metabolické aktivity buněk. Čím tmavší barva roztoku (vyšší absorbance), tím vyšší aktivita buněk. Na základě těchto roztoků bylo provedeno spektrofotometrické měření při vlnových délkách 570 a 650 nm. Získané hodnoty byly zpracovány v Excelu. Na obrázku 29 jsou jasně vidět rozdíly intenzity zabarvení nejen mezi samotnými materiály, ale i mezi vzorky ze shodných materiálů.



Obr. 29 MTT test

9.3.2 Fluorescenční mikroskopie

Princip metody spočívá v aplikaci fluorescenční látky, v tomto případě propidia jodidu. Propidium jodid se váže na buněčná jádra a tím dochází k posunu a zesílení spektra fluorescence. Metoda umožňuje charakterizovat buněčná jádra. Aby došlo k proniknutí

fluorescenční látky do jádra buňky, je nutné porušit její membránu. Toho lze dosáhnout za pomoci mraženého metanolu, který buňky současně zafixuje.

9.3.3 SEM

K získání snímků na rastrovacím elektronovém mikroskopu je důležité tkáňové nosiče zafixovat v GTA a následně odvodnit etanolovou řadou. Metoda pomáhá vizuálně posoudit adhezi a proliferaci buněk na scaffoldu.

9.4 *In-vitro* testování

9.4.1 Příprava buněk

Buňky byly kultivovány v kultivačních lahvičkách s médiem DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) obohaceném o 10% FBS a 1% směsí antibiotik. Kultivace probíhala v inkubátoru s 5% CO₂ při teplotě 37°C. Poté, co souvislá vrstva buněk pokrývala dno kultivační lahvičky z 80%, bylo odsáto médium, buňky byly propláchnuty PBS a následně byly ztrypsinizovány. Po přidání nového média se stanovil se počet buněk pomocí Bürkerovy komůrky. K experimentu bylo použito 10⁴ buněk do každé testovací jamky 96-jamkové destičky.

9.4.2 Příprava materiálu

Z vyrobeného materiálu byly připraveny kruhové vzorky o průměru 6mm, což odpovídá velikosti jamek kultivační destičky. Pro každý materiál bylo potřeba připravit dvacet vzorků – dvanáct pro MTT test, tři na SEM, tři na fluorescenci a zbylé dva jako kontrola. Materiál byl před osazením buňkami sterilizován v 70 % ethanolu po dobu třiceti minut. Po sterilizaci se vzorky 2x propláchly v PBS pro odstranění zbytku

etanolu. Na připravené vzorky se nasadilo 10^4 buněk v 200 μ l kompletního média. Každý materiál měl jeden vzorek kontrolní, který byl pouze v médiu bez buněk. Scaffoldy byly inkubovány při 37°C po dobu 12 dnů. Médium bylo vyměňováno dvakrát až třikrát týdně dle potřeby z důvodu dostatku živin pro množení a růst buněk.

9.4.3 Příprava vzorků pro fluorescenční mikroskopii

Snímky byly pořízeny po 2., 7. a 12. dni testování. Vzorek scaffoldu byl ponořen na 20 minut do vymraženého metanolu. Dochází k fixaci vzorku, který se následně promyje 2 μ l PBS. Poté se obarví fluorescentem, v tomto případě propidium jodidem od firmy SIGMA-ALDRICH. Po tomto procesu je již vzorek připravený pro fluorescenční mikroskop. Snímky byly pořízeny se stonásobným zvětšením v programu Scope Image Plus.

9.4.4 Příprava vzorků pro elektronovou mikroskopii

Snímky byly pořízeny po 2., 7. a 12. dni testování. Vzorky polymerů byly ponořeny na 20 minut do 2,5% GTA v PBS a tím zafixovány. Následně se vzorky promyly vzrůstající ethanolovou řadou s koncentrací 60%, 70%, 80%, 90%, 96% a 100% v 5-ti minutových intervalech. Odvodněné vzorky byly umístěny na terčík, pozlaceny a analyzovány na SEM.

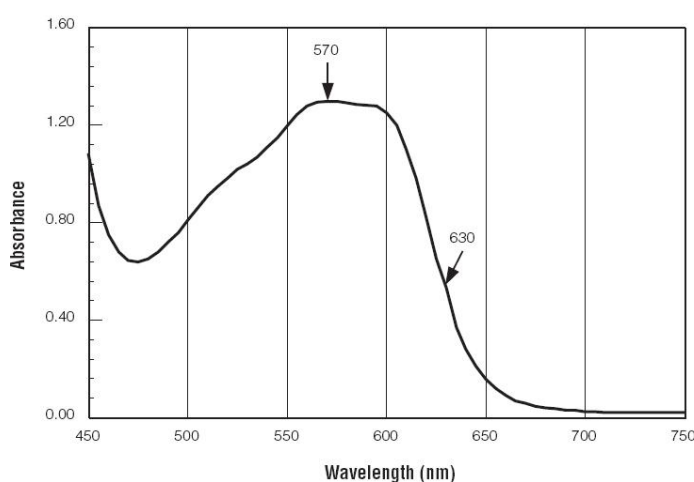
9.4.5 Příprava vzorků pro MTT test

K experimentu bylo zapotřebí celkem dvanáct vzorků scaffoldu. Testování probíhalo ve 2., 7. a 12. dni testování, přičemž se v každém dni zkoumaly čtyři vzorky. Na základě výsledků z více měření bylo možné provést statistické vyhodnocení.

Testované scaffoldy byly nejprve vloženy do sterilní 96 jamkové destičky se směsí 150 μ l média a 50 μ l roztoku MTT. Následně byly uloženy do inkubátoru s 37°C po dobu 4 hodin. Po vyjmutí z inkubátoru byly na scaffoldu zřetelné fialové krystaly. K jejich rozpuštění se použil isopropanol. Vzniklý zabarvený roztok se přemístil do nových jamek a bylo provedeno měření absorbance roztoku odpovídající viabilitě buněk. Získané hodnoty byly zpracovány v programu Excel. Z výsledků byly vypočítány naměřené absorbance, které byly zaznamenány do grafu s chybovými úsečkami. K výpočtu neznámé látkové koncentrace může být využita kalibrační křivka, díky které je možné zjistit přibližné množství buněk na scaffoldu.

Spektrofotometr

Vyhodnocení MTT testu bylo provedeno na spektrofotometru od firmy BioTek. Metoda stanovuje koncentraci látky v roztoku na základě pohlcování světla v různých vlnových délkách světla, které se dají přesně určit. Absorbanční spektrum formazanu bylo doporučeno výrobcem zaznamenávat na základě hodnot absorbance vrcholu při 570 nm. Dále se měřila tzv. referenční délka při 650 nm. Tato vlnová délka slouží k odečtení pozadí, např. buněčného odpadu, otisků prstů a dalších nespecifických absorbancí. Obrázek 30 znázorňuje křivku absorbance formazanu[43].



Obr. 30 Absorbance spektra formazanu rozpuštěném v roztoku

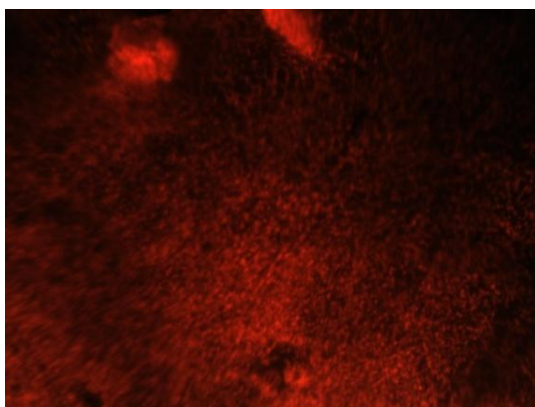
9.5 Výsledky a diskuze

9.5.1 Výsledky fluorescenčního mikroskopu

Snímky z fluorescenčního mikroskopu slouží pro objektivní vizuální posouzení množství živých buněk na scaffoldu. Snímky jsou pořízeny se stonásobným zvětšením, můžeme tedy plošně pozorovat porostlý vzorek.

Scaffoldy ze směsi PCL + CS jsou po dvanácti dnech porostlé v celé ploše scaffoldu, stejně tak čisté PCL, PA6 a PAN. Naopak u PVA můžeme pozorovat pouze několik míst na ploše materiálu, kde jsou patrná buněčná jádra. Vyhodnocení některých scaffoldů je obtížné díky autofluorescenci samotných vláken např. u scaffoldu PVP.

Snímek níže (obr.31) je pouze ilustrativní, výsledné snímky ze 12. dne testování jsou k vidění v příloze.



Obr. 31 Snímek vzorku PAD z fluorescenčního mikroskopu, 12. den testování, 100x zvětšeno

9.5.2 Výsledky SEM

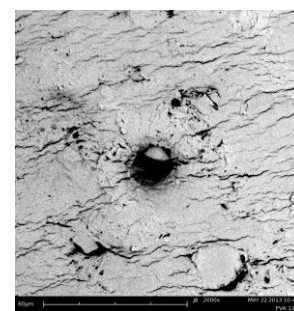
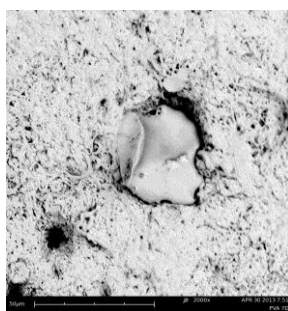
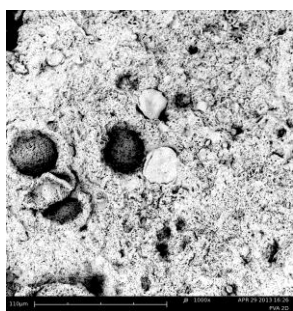
Snímky na SEM byly prováděny na každém scaffoldu po 2., 7. a 12. dni testování. Na snímcích scaffoldu z PVA není očividné, zda je povrch porostlý buňkami. Díky snímkům z fluorescenčního mikroskopu se ale můžeme konstatovat, že je PVA částečně

porostlý. Nízká adheze buněk byla pravděpodobně zapříčiněna změnou struktury povrchu materiálu po sterilizaci ethanolem a následném smočení v mediu. Tento materiál by zřejmě potřeboval dodatečné síťování, aby nedocházelo ke změnám. Podobný výsledek nastal i u scaffoldu z PVP, na jehož povrchu také nejsou rozpoznatelné buňky. Síťování materiálu nebylo pravděpodobně dostačující. Na scaffoldech z PA6, PAN a PCL je možno sledovat nárůst buněk během jednotlivých dnů testování. U testovaných směsí PCL + CS dochází v jednotlivých dnech také k nárůstu buněk, které pokrývají z většiny povrch scaffoldu.

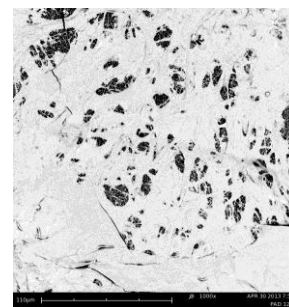
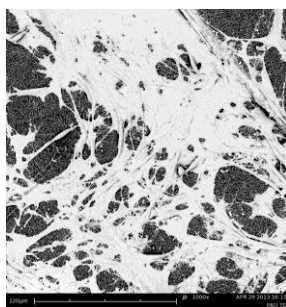
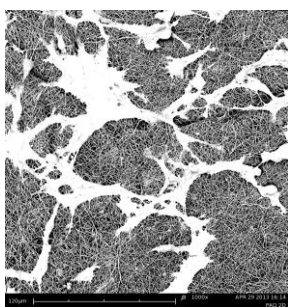
2.den

7.den

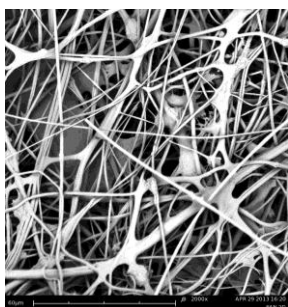
12.den



Obr. 32 PVA 1000x, 2000x, 2000x zvětšeno



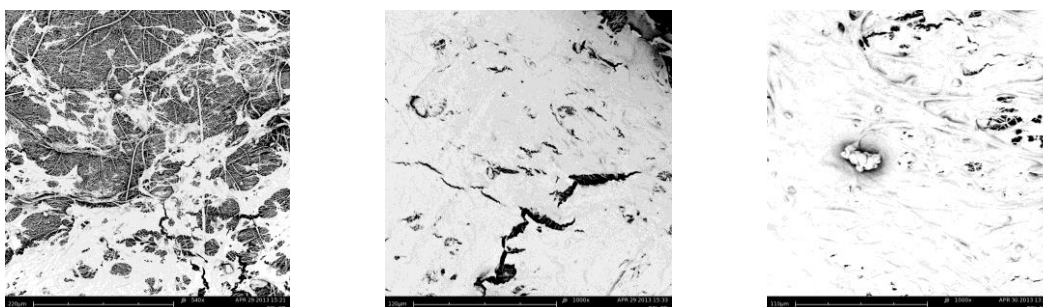
Obr. 33 PA6 1000x, 1000x, 1000x zvětšeno



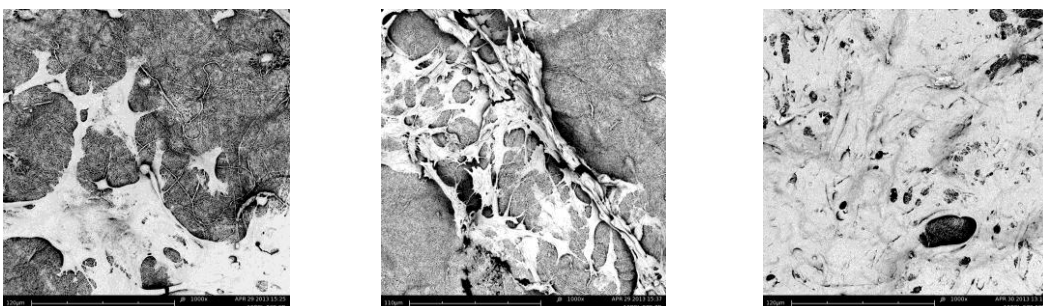
Obr. 34 PAN 2000x, 1000x, 1000x zvětšeno



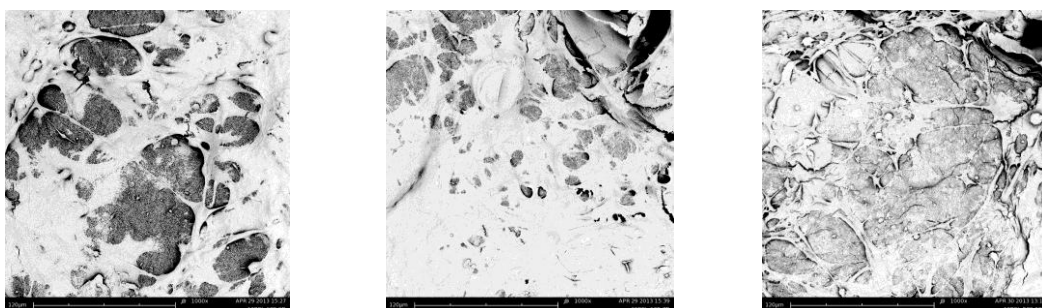
Obr. 35 PVP 1000x, 3000x, 3000x zvětšeno



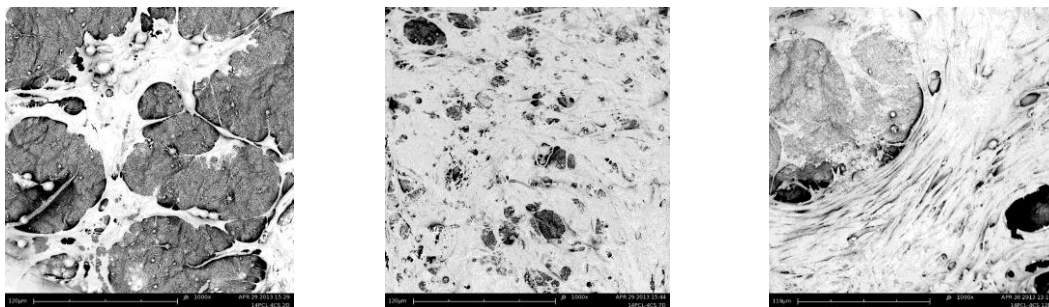
Obr. 36 PCL 540x, 1000x, 1000x zvětšeno



Obr. 37 10%PCL + 8%CS 1000x, 1000x, 1000x zvětšeno



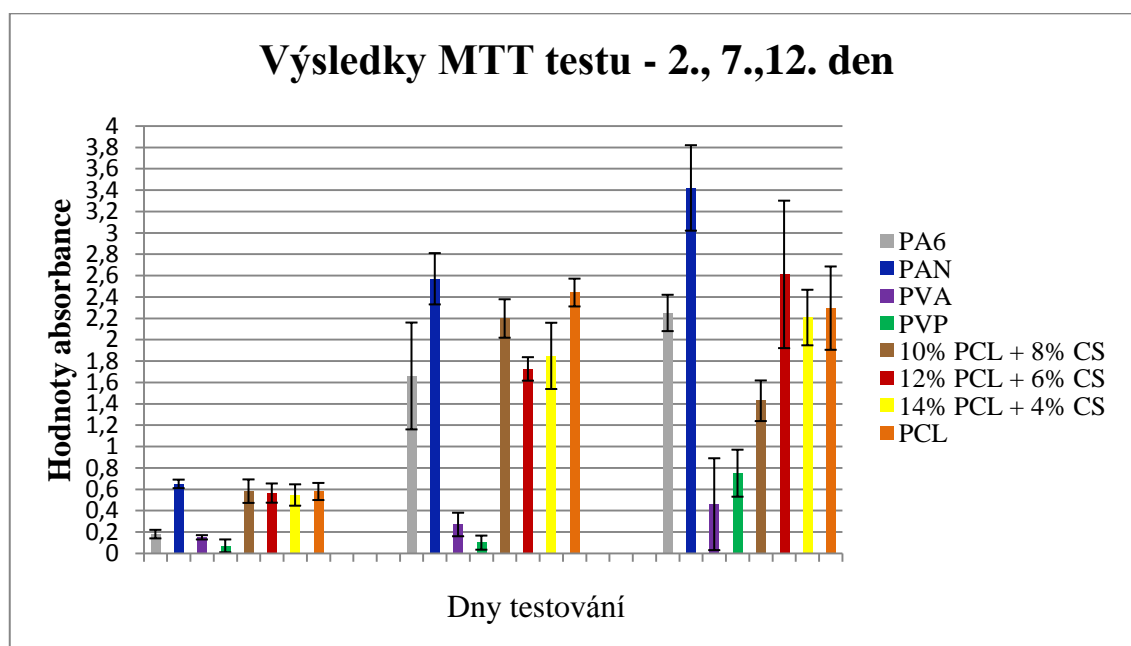
Obr. 38 12%PCL + 6%CS 1000x, 1000x, 1000x zvětšeno



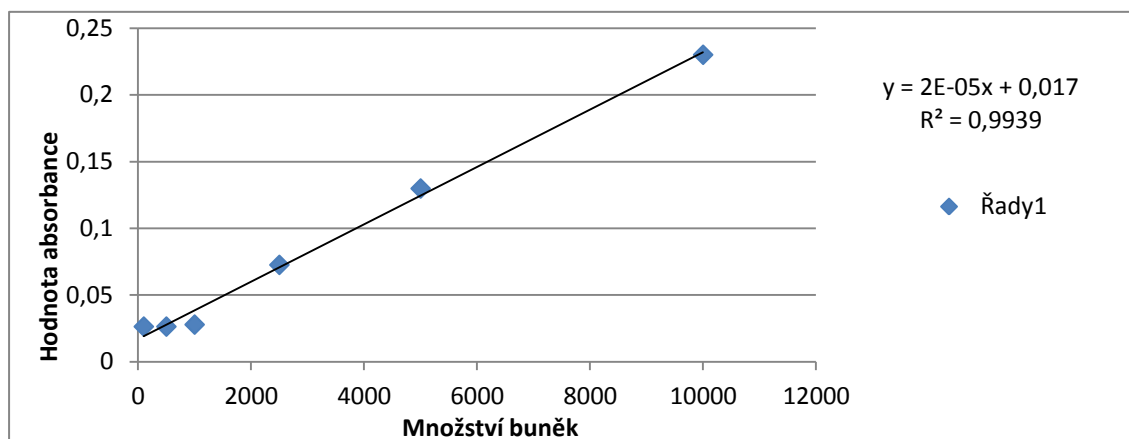
Obr. 39 14%PCL + 4%CS 1000x, 1000x, 1000x zvětšeno

9.5.3 Výsledky MTT testu

Na následujícím obrázku 40 jsou vyobrazeny v grafu jednotlivé materiály a jejich hodnoty absorpance v daných dnech testování. Pro znázornění výsledků byl použit sloupkový graf s chybovými úsečkami. Vzorky scaffoldů z PVP a PVA jsou pod mezí detekce, což je v souladu s výsledky z mikroskopie. Na obrázku 41 je zobrazena kalibrační křivka pro MTT testování.



Obr. 40 Grafické znázornění metabolické aktivity buněk ve 2., 7. a 12. dni testování



Obr. 41 Kalibrační křivka

Buňky adherovaly na scaffoldy vyrobené z PAN, PCL a PCL + CS, u ostatních materiálu byla adheze velmi slabá.

Z obrázku grafu můžeme sledovat, že byl u všech materiálů zaznamenán nárůst metabolické aktivity buněk mezi druhým a sedmým dnem testování. Zatím co u vzorků z PVA a PVP byl nárůst minimální, u ostatních materiálů, včetně PA6, došlo ke značnému nárůstu metabolické aktivity buněk. Nejvyšší hodnotu metabolické aktivity měl extrémně hydrofilní scaffold z PAN, druhá nejvyšší hodnota byla zaznamenána u scaffoldu z hydrofobního PCL.

Po dvanácti dnech experimentu došlo ke změně rostoucího trendu. Scaffold z PCL vykazoval nižší hodnoty než v předchozím dni testování, zatím co hodnoty vzorku z 10%PCL + 8%CS poklesly významně. Pokles metabolické aktivity má pravděpodobně za následek nedostatečně pevná adheze buněk na hydrofobní materiál.

Scaffold z PAN měl ve 12. dni testování opět jednoznačně nejvyšší hodnotu absorbance. Přestože na snímcích scaffoldu z extrémně hydrofilního PVP nejsou znatelné buňky, v grafu byl zaznamenán nárůst hodnot absorbance mezi 7. a 12. dnem.

Nárůst metabolické aktivity buněk po sedmém dni byl pravděpodobně způsoben rychlejším dělením buněk v těchto dnech experimentu. Ve výsledku byly hodnoty absorbance materiálu z PVP vyšší než hodnoty PVA. Nicméně měly hodnotu srovnatelnou s absorbancí po dvou dnech u materiálů, na které buňky adherovaly úspěšně (PAN, PCL, PCL + CS).

Shrneme-li výsledky všech materiálů, získáme následující závěr. Nejvyšší hodnoty absorbance byly ve všech dnech testování naměřeny u scaffoldu extrémně hydrofilního PAN. Poměrně srovnatelné hodnoty mají scaffoldy z PA6, PCL, 12%PCL + 6%CS a 14%PCL + 4%CS. U vzorku 10%PCL + 8%CS došlo k výraznému úbytku metabolické aktivity buněk, tudíž jeho hodnoty absorbance ve dvanáctém dni testování patřily k nejnižším spolu se scaffoldy z PVA a PVP.

Závěr

V teoretické části práce byl popsán úvod do problematiky tkáňového inženýrství a biologie obecně. Byly zde formulovány pojmy týkající se tohoto vědního oboru a poté přiblíženy technologické postupy výroby nanovláknenných scaffoldů. Dále byly popsány jednotlivé materiály, které se používají pro výrobu scaffoldů a důležité vlastnosti jako je biokompatibilita či biodegradabilita.

Smáčení a kontaktní úhel je další důležitý pojem vysvětlený v této práci. Byla zde rozebrána metoda přímého měření kontaktního úhlu a vliv smáčení na buněčnou adhezi.

Praktická část byla zaměřena na výrobu scaffoldu elektrospinningem a poté na jeho testování. Testovány byly materiály PVA, PCL, PVP, PA6, PAN, 10%PCL + 8%CS, 12%PCL + 6%CS a 14%PCL + 4%CS. Scaffoldy byly podrobeny měření kontaktního úhlu a průměru vláken, dále se zkoumala změna povrchu materiálu po smočení ve vodě a v ethanolu.

Průměry vláken většiny testovaných scaffoldů se pohybují v rozmezí 50-515 nm. Nejslabší vlákna obsahuje scaffold z 14%PCL + 4%CS. Naopak nejsilnější vlákna obsahuje PAN a PVP. Při měření kontaktního úhlu bylo zjištěno, že materiály PVA, PVP, PA6 a PAN jsou extrémně hydrofilní. U těchto materiálů nemohl být změřen kontaktní úhel. Směsi PCL + CS se jevily jako hydrofilní, samotný PCL byl jako jediný testovaný materiál hydrofobní.

Jak bylo popsáno v podkapitole 6.2 o vlivu smáčení povrchu materiálu na buněčnou adhezi, extrémně hydrofilní materiál by neměl umožňovat tento proces. Podobně by adheze buněk ve větší míře neměla nastat u hydrofobního materiálu.

Z výsledků po biologickém testování však bylo zjištěno, že scaffold vyrobený z extrémně hydrofilního PAN vykazoval nejvyšší metabolickou aktivitu buněk. Dalším scaffoldem s dobrými výsledky byl extrémně hydrofilní PA6. Tyto výsledky jsou v rozporu s předešlým tvrzením, že na extrémně hydrofilních materiálech je téměř vyloučená adheze buněk. Pokud by byly materiály testovány v delším časovém intervalu, mohlo by dojít k úbytku buněk na scaffoldu vlivem slabých sil mezi adhezními molekulami buněk a povrchem materiálu.

Hydrofobní scaffold z PCL potvrzuje předchozí výsledky, které naznačují, že smáčivost materiálu nemá předpokládaný vliv na adhezi buněk. Výsledky vykazují v porovnání s ostatními materiály také vysokou metabolickou aktivitu buněk.

U hydrofilních scaffoldů ze směsi PCL + CS nebyl zaznamenán výraznější vliv na adhezi buněk přidáním hydrofilního chitosanu než u čistého PCL, jak se předpokládalo. Z výsledků metabolické aktivity buněk po dvanácti dnech testování můžeme konstatovat, že pro buňky bylo z těchto směsí nejvhodnější prostředí scaffoldu z 12% PCL + 6% CS.

Testované extrémně hydrofilní scaffoldy z PVA a PVP měly hodnoty absorbance a tedy i metabolickou aktivitu nejnižší. Tyto materiály byly dodatečně síťovány, což mělo pravděpodobně vliv na adhezi buněk k povrchu. Samotný proces síťování může mít vliv na buňky (síťovací činidla mohou být cytotoxická, popřípadě se mohou po ozáření vyskytovat volné radikály apod.). Z testu změny struktury povrchů materiálů po smočení do vody a ethanolu bylo zjištěno nedostatečné síťování scaffoldu z PVA. Změna struktury povrchu nastala u scaffoldu z PVP. Tento jev by mohl mít také za následek nízkou adhezi buněk na povrchu materiálu. Přesto u scaffoldu z PVP došlo k nárůstu metabolické aktivity buněk mezi sedmým a dvanáctým dnem testování.

Přestože scaffoldy z PAN a PVP jsou extrémně hydrofilní a mají podobné hodnoty průměru vláken, jejich hodnoty metabolické aktivity buněk se výrazně liší. Je to způsobeno pravděpodobně změnou struktury materiálu PVP v kapalině.

Z výsledků porovnání smáčivosti materiálu s hodnotami absorpce můžeme říci, že tato vlastnost scaffoldu nemá přímý vztah k buněčné adhezi. Na adhezi buněk neměl vliv ani průměr vláken, buňky adherovaly jak na mikrovláknenné, tak i na nanovláknenné struktury. Proto je důležité hodnotit struktury komplexně.

U nanovláknenných materiálů hraje při měření smáčivosti důležitou roli drsnost povrchu, proto i měření smáčivosti udává nepřesné výsledky. Hydrofilita materiálu je určována z měření smáčivosti hladkých fólií, proto je PCL považován za hydrofobní a PVA a PVP hydrofilní. Další vlastnosti materiálu ovlivňující adhezi buněk, jsou elektrický náboj a vodivost povrchu, změny povrchové energie a smáčivosti vlivem povrchových úprav a jiné.

Hodnocení struktury materiálů je natolik složité, že jej nestačíme v rámci jedné diplomové práce obsáhnout. Dalšími získanými odpověďmi z oboru tkáňového inženýrství můžeme výrobu scaffoldu a tím i náhradu tkáně či orgánu výrazně zjednodušit.

Seznam použité literatury

- [1] LUKÁŠ, David. *Lékařské textilie*. Liberec: Technická univerzita v Liberci, 2009. ISBN 978-80-7372-475-7.
- [2] BAČÁKOVÁ, L., E. FILOVÁ, F. RYPÁČEK, V. ŠVORČÍK a V. STARÝ. *Cell Adhesion on Artificial Materials for Tissue Engineering*. PHYSIOLOGICAL RESEARCH [online]. 2004, č. 53, s. 10 [cit. 2013-12-07]. Dostupné z: <http://193.51.50.30/master/Biblio%20D1/BACAKOVA%202004.pdf>
- [3] SIPE, Jean, KELLEY Christine a MCNICOL Loré Anne. *Reparative Medicine: Growing Tissues and Organs*. In: Annals of the New York Academy of Sciences. 2006, roč. 1, č. 961, s. 13-14.
- [4] BAČÁKOVÁ, Markéta a POŘÍZEK Martin. *Úvod do tkáňového inženýrství a biomateriálů*. Praha: FYZIOLOGICKÝ ÚSTAV AVČR, 2012.
- [5] VÍT, Vítězslav. Urologické listy. Buněčná proliferace a diferenciaci, buněčný cyklus a jeho kontrola. 2004, č. 3.
- [6] Epitelová tkáň. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2013-05-21]. Dostupné z: http://cs.wikipedia.org/wiki/Epitelov%C3%A1_tk%C3%A1%C5%88
- [7] MASOPUST, Jaroslav a PRŮŠA Richard. *Patobiochemie Buňky*. 1. vyd. Praha: Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, 2003. ISBN 80-239-1011-0.
- [8] REKTOROVÁ, Irena. *Tkáňové inženýrství a klonování*. In: Neurologie pro praxi. 2002, č. 1.
- [9] ALBERTS, Bruce, BRAY Dennis, OHNSON Alexander J, LEWIS Julian, RAFF Martin, ROBERTS Keith a WALTER Peter. *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Ústí nad Labem: Espero Publishing, 1998. ISBN 80-902906-2-0.
- [10] KING, Robert C., STANSFIELD WILLIAM D. a MULLIGAN PAMELA K. *A Dictionary of Genetics*. 7. vyd. Oxford: Oxford University Press, 2006. ISBN 13 978-0-19-530762-7; 978-0-19-530761-0.

- [11] VEJRAŽKA, Martin. *Buněčné kultury*. Praha. Dostupné z: <http://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/textova-verze-prednasek/bunecne-kultury-vejrazka.pdf>
- [12] PHAM, Quynh, HARMAUpma S a MIKOS Antonios. *Electrospinning of Poly-meric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review*. In: Tissue Engineering. 2006, roč. 12, č. 5, s. 1197-1211.
- [13] NAFIGATE. *Nanofibers gateway* [online]. 2011 [cit. 2013-02-06]. Dostupné z: <http://www.nafigate.com/cs>
- [14] ROZMAJZL, Petr. *Makromolekulární látky*. Liberec. Dostupné z: <http://chemie.gfxs.cz/data/plasty/plasty.pdf>
- [15] CHEUNG, Hoi-Yan, LAU Kin-Tak, LU Tung-Po a HUI David. *A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development. Composites: Part B engineering*. 2007, č. 38, s. 291-300.
- [16] PETRÁŠ, David. KIMMER DUŠAN, SOUKUP KAREL a KLUSOŇ PETR. *Chemické listy. Bezpečná nanovlákná*. 2009, č. 103, s. 1009-1016. ISSN 1213-7103. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/cz/index.html>
- [17] ARNDT, Tomáš. *Kolagen. Celostní medicína* [online]. 2009 [cit. 2013-02-06]. Dostupné z: <http://www.celostnimedicina.cz/kolagen.htm>
- [18] GUILLÉN, M.C. Gómez, GIMÉNEZ B., LÓPEZ-CABALLERO M.E. a MONTERO M.P.. *Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review*. In: Food Hydrocolloids. 2011, č. 25, s. 1813-1827. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X11000427#>
- [19] PILLAI, C.K.S., Willi PAUL a Chandra P. SHARMA. *Chitin and chitosan polymers* In: Chemistry, solubility and fiber formation. Progress in Polymer Science. 2009, č. 34, 641–678. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079670009000318>
- [20] CROISIER, Florence Croisier a JÉRÔME Christine. *Chitosan-based biomaterials for tissue engineering*. In: European Polymer Journal. 2013, roč. 49, č. 4, s. 780-792.

[21] ELSABEEA, Maher Z., NAGUIBA Hala F. a MORSI Rania Elsayed. *Chitosan based nanofibers, review*. In: Materials Science and Engineering. C. 2012, roč. 32, č. 7, s. 1711-1726.

[22] GUNATILLAKE, Pathiraja A. a ADHIKARI Raju. *Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering*. In: European Cells and Materials. 2003, č. 5, s. 1-16. DOI: 1473-2262.

[23] *Polyvinylpyrrolidone*. In: WiseGEEK [online]. 2007 [cit. 2013-05-21]. Dostupné z: <http://www.wisegeek.com/what-is-polyvinylpyrrolidone.htm>

[24] AKGÖL, Sinan, KAC Yasemin ,AR, DENIZLI Adil a ARICA M.Y. *Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized onto novel magnetic polyvinylalcohol microspheres*. Food Chemistry. 2001, č. 74, 281–288. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814601001509>

[25] SPĚVÁČEK, Jiří, BRUS Jiří, DIVERS Thomas a GROHENS Yves. *Solid-state NMR study of biodegradable starch/polycaprolactone blends*. In: European Polymer Journal. 2007, č. 43, 1866–1875. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001430570700119X>

[26] HERMANOVÁ, Soňa. *Chempoint* [online]. 2012 [cit. 2012-09-21]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/polykaprolakton-biodegradabilni-polyester> Fakulta textilní Technické univerzity v Liberci

[27] WOODRUFF, Maria Ann a HUTMACHER Dietmar Werner. *The return of a forgotten polymer- Polycaprolactone in the 21st century*. In: Progress in Polymer Science. 2010, roč. 35, č. 10, s. 1217-1256

[28] *Polyethylenglykol*. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2013-01-21]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Polyethylenglykol>

[29] *Polyacrylonitrile (PAN)*. In: Encyclopædia Britannica [online]. 2012 [cit. 2013-05-13]. Dostupné z: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/468259/polyacrylonitrile-PAN>

[30] WANG, Zhen-Gang, WAN Ling-Shu a XU Zhi-Kang. *Surface engineerings of polyacrylonitrile-based asymmetric membranes towards biomedical applications: An*

overview. In: Journal of Membrane Science [online]. 2007, č. 304 [cit. 2013-05-23]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0376738807003444>

[31] SENTHILKUMAR, S., RAJESH S., JAYALAKSHMI A. a MOHAN D.. *Biocompatibility Studies of Polyacrylonitrile Membranes Modified with Carboxylated Polyetherimide*. In: Materials Science & Engineering C. 2013. DOI: 10.1016/j.msec.2013.04.043.

[32] *Polyamidová vlákna*. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001 [cit. 2013-05-13]. Dostupné z: http://cs.wikipedia.org/wiki/Polyamidová_vlákna

[33] NIRMALA, R., NAVAMATHAVAN R., KANG Hyung-Sub, EL-NEWEHYD Mohamed H. a KIM Hak Yong. *Preparation of polyamide-6/chitosan composite nanofibers by a single solvent system via electrospinning for biomedical applications*. In: ScienceDirect [online].2011, č.83 [cit.2013-05-23]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776510006405>

[34] PHAM, QUYNH P., SHARMA UPMA a MIKOS ANTONIOS G.. *Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review*. *Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review* [online]. 2006, č. 12, s. 16 [cit. 2013-05-12]. Dostupné z: http://www.thefutureisnear.org/student_research/current_research/documents/drugencapsulation/xq21.pdf

[35] *Technologie Nanospider*. ELMARCO: nano for life [online]. 2012 [cit. 2013-02-08]. Dostupné z: <http://www.elmarco.cz/technologie/technologie/>

[36] SHAFRIN, SHAFRIN Elaine G. a ZISMAN William A. *Constitutive relations in the wetting of low energy surfaces and the theory of the retraction method of preparing monolayers*. In: The journal of physical chemistry. 1960.

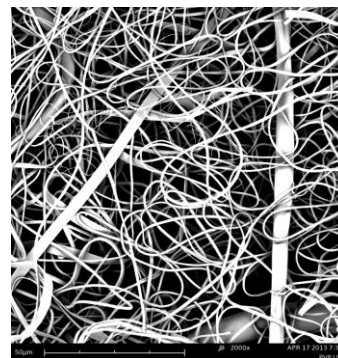
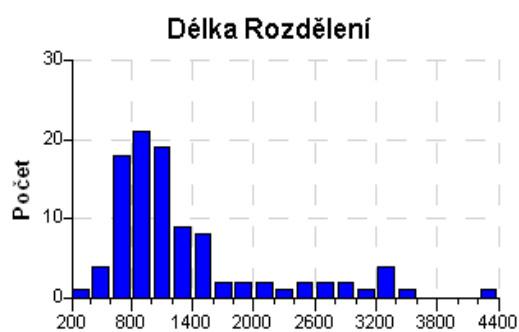
[37] VIKOVÁ, Martina. *Kontaktní úhel*. In: Technická univerzita v Liberci [online]. 2010 [cit. 2013-05-13]. Dostupné z: http://www.ft.tul.cz/depart/ktc/incl de/osobni_stranky/vikova.martina/teaching/11smac3.pdf

- [38] BAČÁKOVÁ, Lucie, FILOVÁ Elena, PAŘÍZEK Martin, RUML Tomáš a ŠVORČÍK Václav. *Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants*. In: Biotechnology Advances [online]. 2011, č. 29, s. 28 [cit. 2013-05-21]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975011000802bac>
- [39] KWANGSOK, Kim. *Control of degradation rate and hydrophilicity in electrospun non-woven poly(d,l-lactide) nanofiber scaffolds for biomedical applications*. In: ELSEVIER [online]. 2003, č. 24, s. 8 [cit. 2013-12-08]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14559011>
- [40] KEDROŇOVÁ, Eva. *Měření kontaktního úhlu sedící kapky jako metoda charakterizace povrchu*. In: Chempoint [online]. 2012 [cit. 2013-05-13]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/mereni-kontaktniho-uhlu-sedici-kapky-jako-metoda-charakterizace-povrchu>
- [41] ZHANG, Y.Z. VENUGOPAL J., HUANG Z.-M., C. LIM T. a RAMAKRISHNA S. *Crosslinking of the electrospun gelatin nanofibers*. In: Elsevier [online]. 2006, č. 47 [cit. 2013-05-22]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032386106001789>
- [42] WENGUO, Cui. *Preparation of hydrophilic poly(L-lactide) electrospun fibrous scaffolds modified with chitosan for enhanced cell biocompatibility*. In: ELSEVIER. 2012, č. 53, s. 7.
- [43] PROMEGA CORPORATION. *CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay*. USA: Promega Corporation, 2012.

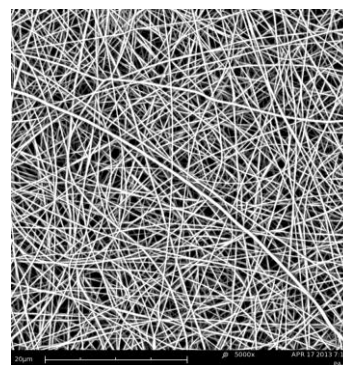
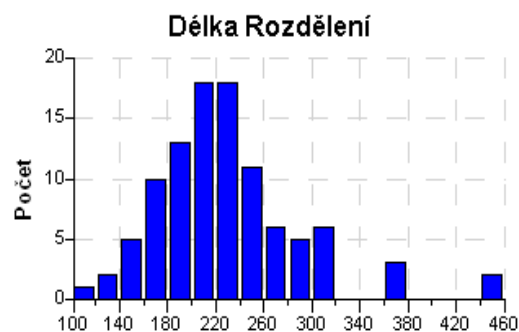
Zdroje obrázků

- [1] *Tissue Engineering*. In: Division of Biology and Medicine [online]. 2006 [cit. 2012-10-23]. Dostupné z: http://biomed.brown.edu/Courses/BI108/BI108_2007_Groups/group12/Homepage.html
- [2] AGARWAL, Seema, WENDORFF Joachim a GREINER Andreas. *Use of electro-spinning technique for biomedical applications*. In: Polymer. 2008, č. 49, s. 5603–5621.
- [3] PETR, J. vtm.cz [online]. [cit. 24.5.2013]. Dostupný na <http://vtm.e15.cz/clanek/nebezpecna-nanovlakna>
- [4] AUTOR NEUVEDEN. Colvita.org [online]. [cit. 24.5.2013]. Dostupný na WWW: <http://colvita.org/co-to-jest-kolagen/>
- [5] AUTOR NEUVEDEN. *Chitosan – Answer to Weight Problems* [online]. [cit. 24.5.2013]. Dostupný na WWW: <http://www.duocthaotrexanh.com/herbal-natural-information/chitosan-answer-to-weight-problems-573.html>
- [6] LUKÁŠ, David. *Lékařské textilie*. Liberec: Technická univerzita v Liberci, 2009. ISBN 978-80-7372-475-7.
- [7] LUKÁŠ, David. *Lékařské textilie*. Liberec: Technická univerzita v Liberci, 2009. ISBN 978-80-7372-475-7.
- [8] DESIGN LIŠKA. Elmarco.cz [online]. [cit. 24.5.2013]. Dostupný na WWW: <http://www.elmarco.cz/fotogalerie/technologie-nanospider/>

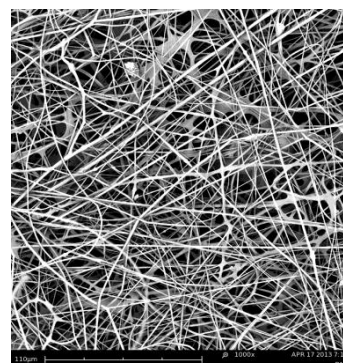
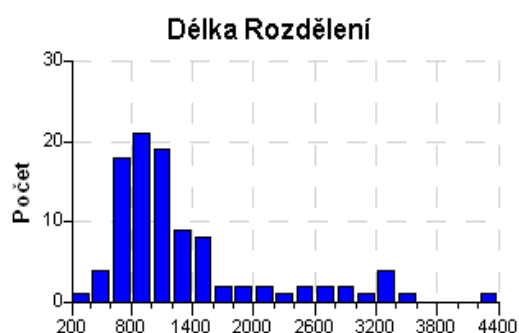
PVP



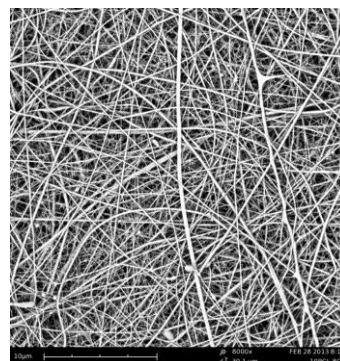
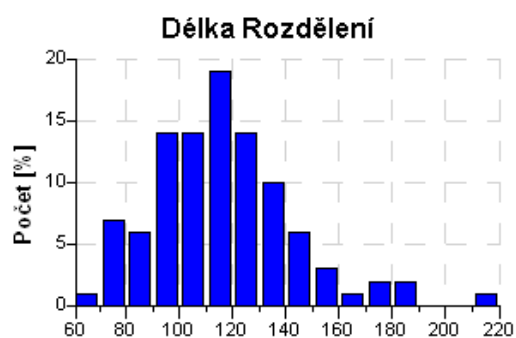
PA6



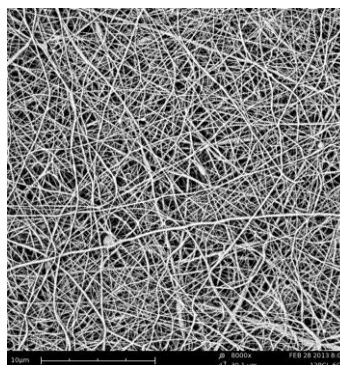
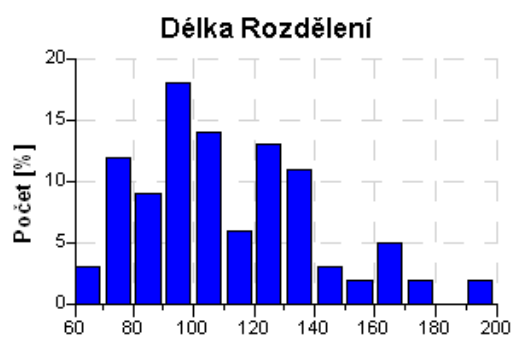
PAN



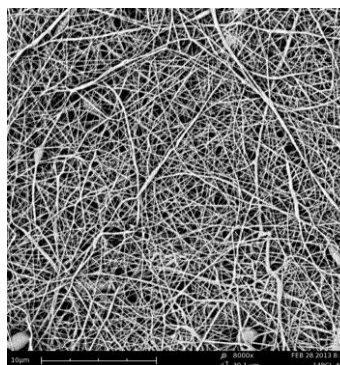
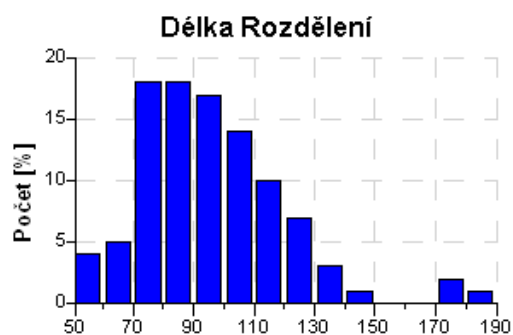
10% PCL+ 8% CS



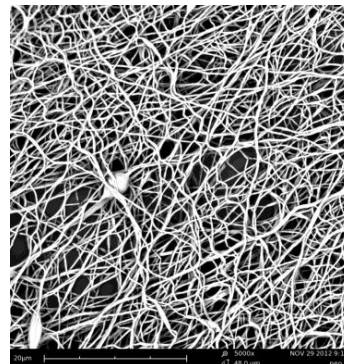
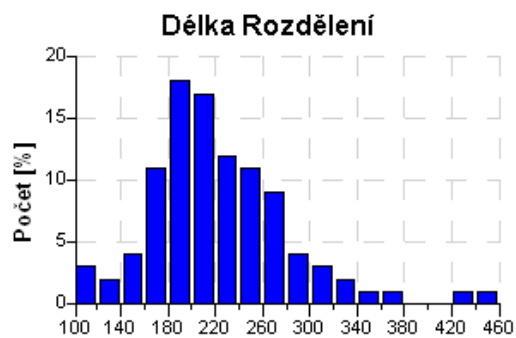
PCL 12% + CS 6%



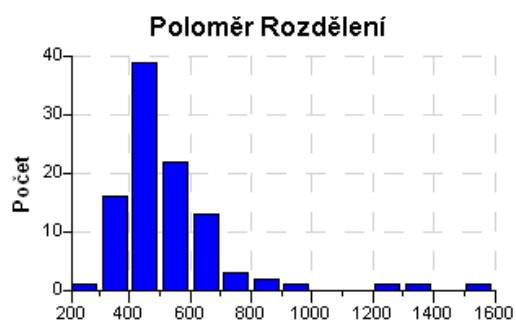
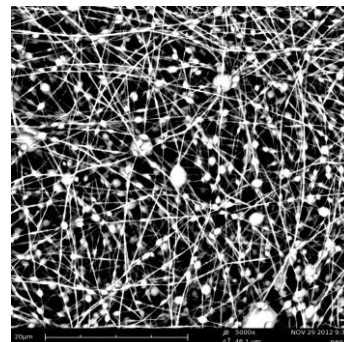
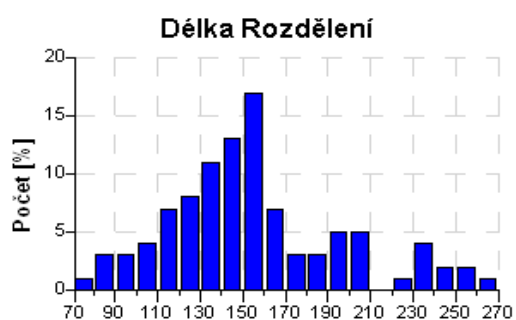
14% PCL+4% CS



PEO 5%



PEO 8%



PŘÍLOHA B:

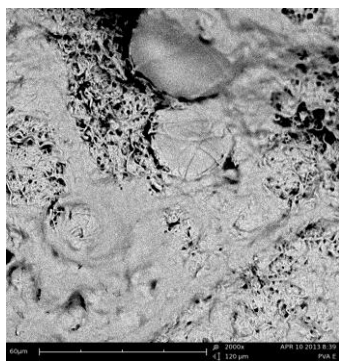
Snímky nanovláknenných scaffoldů promytých etanolem a vodou. Snímky byly pořízeny na elektronovém rastrovacím mikroskopu.

ETHANOL

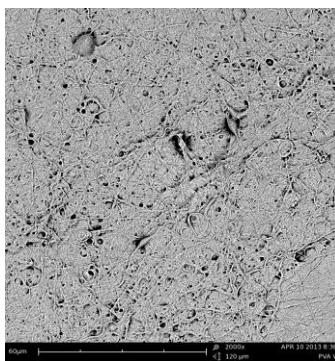
VODA

KONTROLA

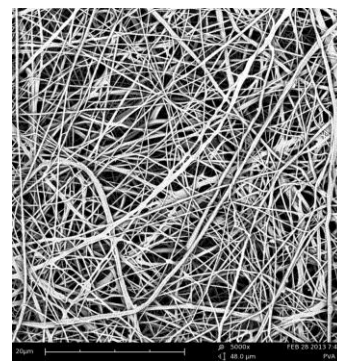
PVA



2000x zvětšení



2000x zvětšení



5000x zvětšení

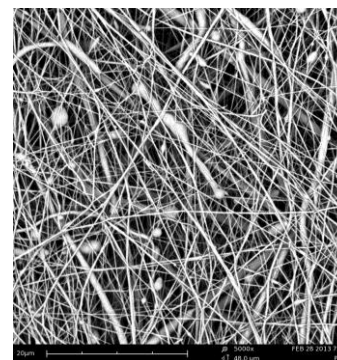
PCL



2000x zvětšeno



2000x zvětšeno

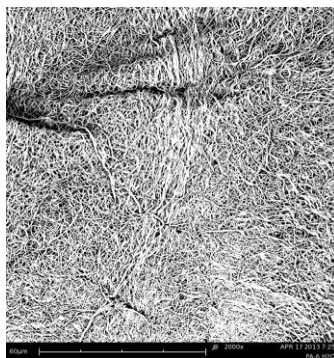


5000x zvětšeno

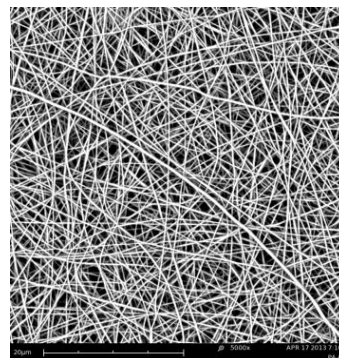
PA6



2000x zvětšeno

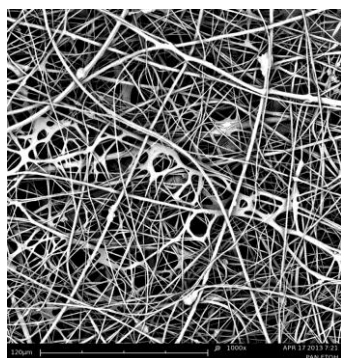


2000x zvětšeno



5000x zvětšeno

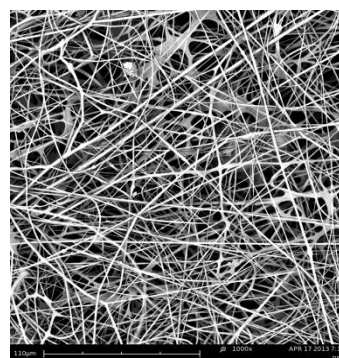
PAN



1000x zvětšeno

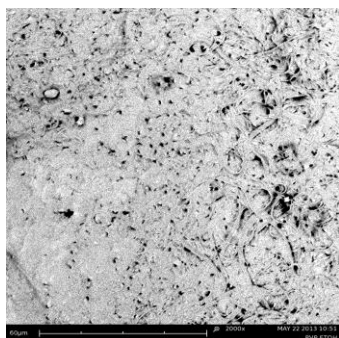


1000x zvětšeno

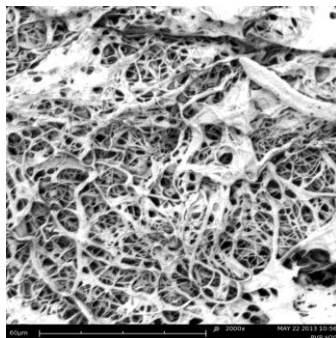


1000x zvětšeno

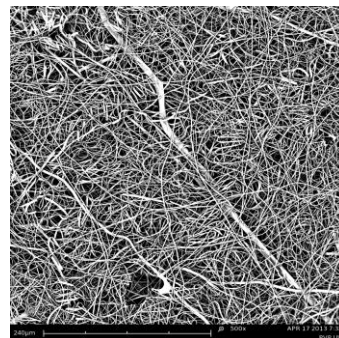
PVP



2000x zvětšeno



2000x zvětšeno

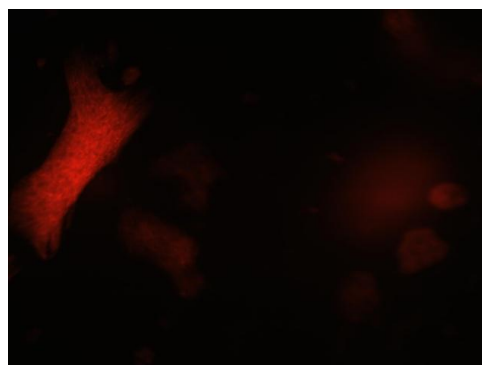
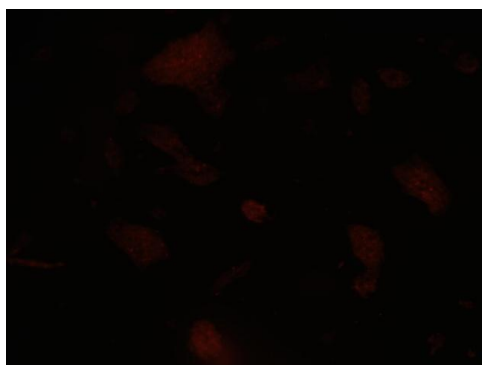


500x zvětšeno

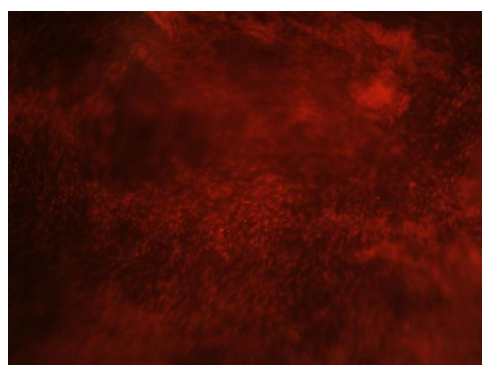
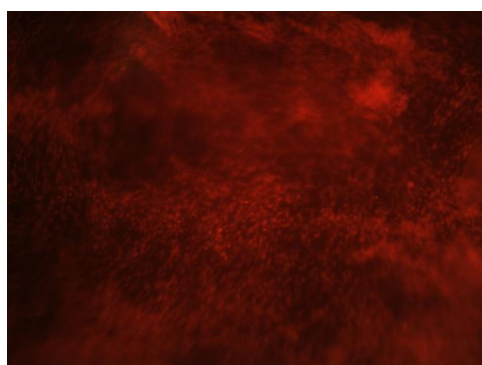
PŘÍLOHA C:

Snímky zachycují jednotlivé polymerní scaffoldy po dvanáctém dni testování, které byly pořízeny na invertovaném fluorescenčním mikroskopu. Všechny snímky jsou stonásobně zvětšeny.

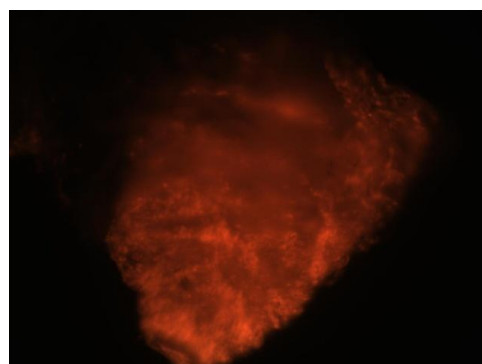
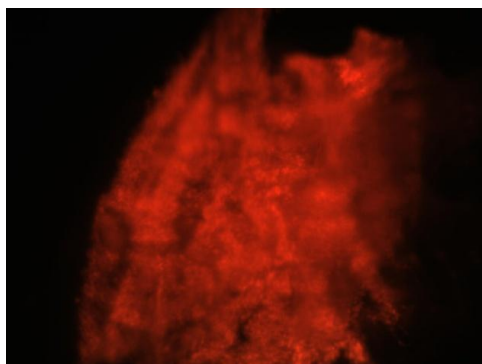
PVA 12. den, 100x zvětšeno



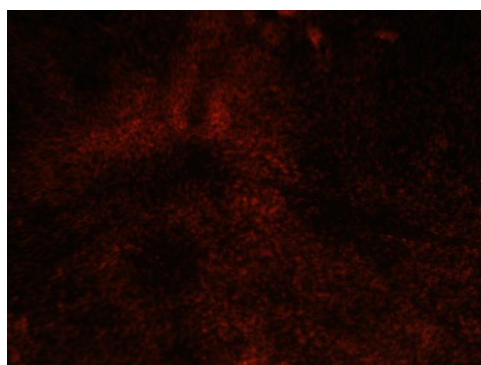
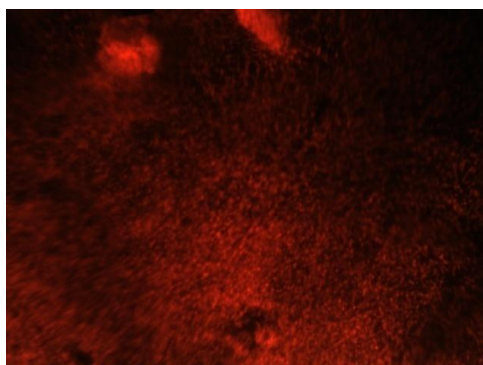
PCL 12. den, 100x zvětšeno



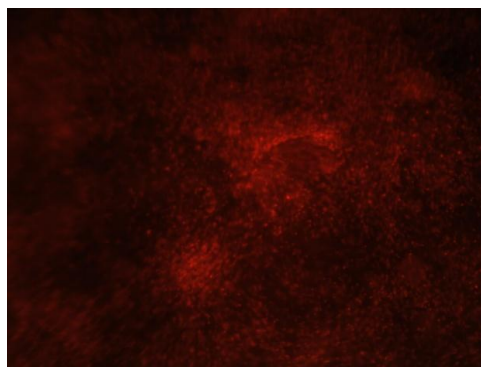
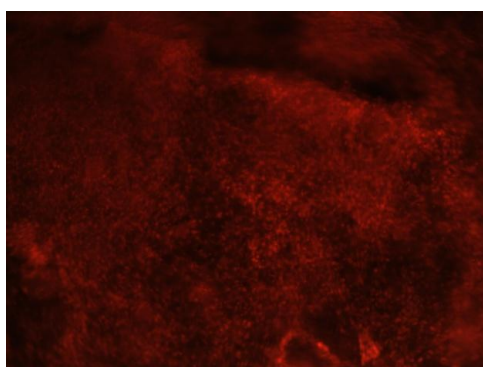
PVP 12. den, 100x zvětšeno



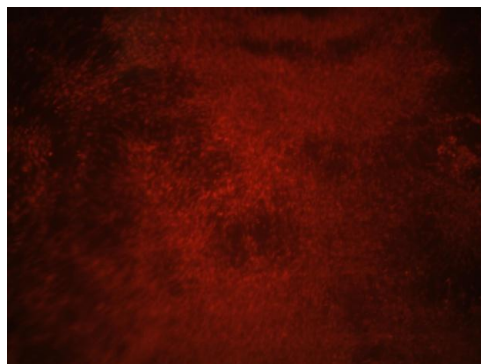
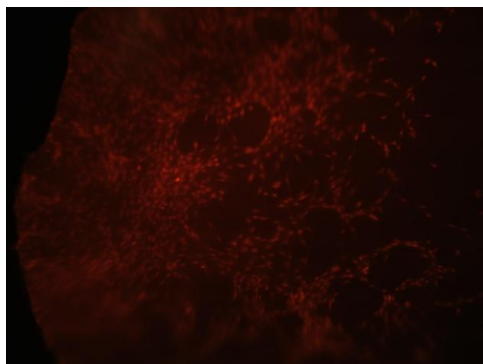
PA6 12. den, 100x zvětšeno



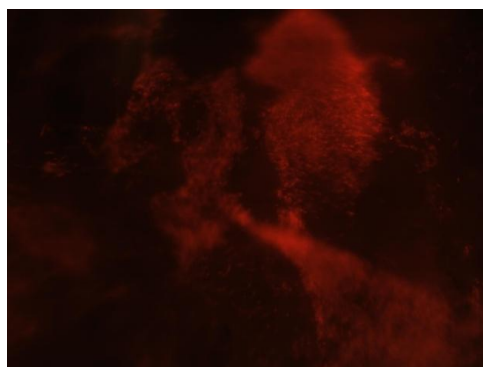
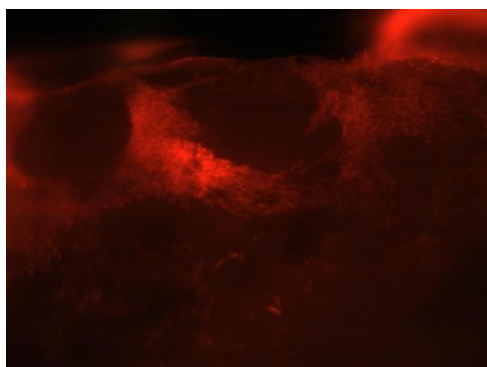
PAN 12. den, 100x zvětšeno



10%PCL+8%CS 12. den, 100x zvětšeno



12%PCL+6%CS 12. den, 100x zvětšeno



14%PCL+4%CS 12. den, 100x zvětšeno

